

**Thioredoxin:
Regulator und Cofaktor
in der assimilatorischen Sulfatreduktion**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

ULRICH SCHRIEK

Dortmund

Bochum 1984

**Thioredoxin:
Regulator und Cofaktor
in der assimilatorischen Sulfatreduktion**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Abteilung Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

ULRICH SCHRIEK

Dortmund

Bochum 1984

Referent : Prof. Dr. A. Trebst

Koreferent ; Prof. Dr. W. Hengstenberg

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Ergebnisse	6
2.1	Thioredoxin: Isolierung, Nachweis und Eigenschaften	6
2.2	Thioredoxin als Aktivator	11
2.2.1	Einfluß von Thioredoxin auf die Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion in vitro	11
2.2.2	APS-Kinase aus <i>C.reinhardtii</i>	12
2.2.2.1	Reinigung des Enzyms	12
2.2.2.2	Kinetik der Enzymaktivierung	13
2.2.2.3	Regulation der APS-Kinase Aktivität in vitro	18
2.2.3	APS-Kinase aus <i>E.coli</i>	19
2.2.3.1	Reinigung und molekulare Eigenschaften des Enzyms	19
2.2.3.2	Einfluß von Thioredoxin auf die APS-Kinase	23
2.2.4	APS-Kinase aus <i>S.cerevisiae</i>	26
2.2.4.1	Reinigung und molekulare Eigenschaften des Enzyms	26
2.2.4.2	Einfluß von Thioredoxin auf die APS-Kinase	30
2.2.5	Zusammenfassender Vergleich: APS-Kinase	35
2.3	Thioredoxin als Cofaktor	38
2.3.1	PAPS-Reduktase-Systeme aus <i>E.coli</i> und <i>S.cerevisiae</i>	39
2.3.1.1	Trennung und Reinigung der Teilkomponenten	39
2.3.1.2	Thioredoxin als Elektronendonator bei der Reduktion von PAPS	40
2.3.1.3	Untersuchung der PAPS-Reduktase auf Sulfo-Thioredoxin als mögliches Zwischenprodukt in <i>E.coli</i>	45

2.3.2	Reduktion von APS und PAPS in <i>C.reinhardtii</i>	49
2.3.2.1	Einfluß von Thioredoxin auf die APS-Sulfotransferase	50
2.3.2.2	Enzymatische Teilaktivitäten der AST	53
2.3.2.4	Bildung und Nachweis eines $^{35}\text{SO}_3$ -markierten Peptids	61
2.3.3	Zusammenfassender Vergleich: Reduktion von aktiviertem Sulfat	67
3.	Diskussion	69
4.	Zusammenfassung	84
5.	Material & Methoden	87
6.	Literaturverzeichnis	99

A b k ü r z u n g e n

ADP	Adenosin 5'-diphosphat
AMP	Adenosin 5'-monophosphat
APhMA	4-Aminophenylmercuriacetat
APS	Adenosin 5'-phosphosulfat
Asc	Ascorbinsäure
AST	APS-Sulfotransferase
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
BSI	Bromsuccinimid
cpm	Zählrate (counts per minute)
Cys	Cystein
DCPIP	2,6 Dichlorphenol-indophenol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitriiloessigsäure
FAD	Flavin-adenin-dinukleotid
FeCy	Kalium hexacyanoferrat(III)
GSH/GSSG	Glutathion reduziert/oxidiert
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
MSH	Mercaptoethanol
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, reduziert
PAP	3'Phosphoadenosin 5'-phosphat
PAPS	3'Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TNBS	2,4,6 Trinitrobenzoesulfonsäure
UDIEF	Ultradünnschicht-Isoelektrische Fokussierung

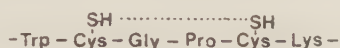


Digitized by the Internet Archive
in 2026

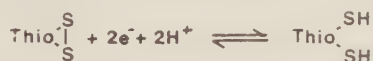
https://archive.org/details/IA41546407_0063

1. EINLEITUNG

Thioredoxine sind ubiquitäre, wasserstoffübertragende Proteine. Ihnen gemeinsam ist ein geringes Molekulargewicht (9 - 16 k), ein vergleichsweise saurer isoelektrischer Punkt (4.5 - 6.2), sowie weitgehende Übereinstimmung in Sekundär- und Tertiärstruktur (Eklund et al 1984). Das aktive Zentrum der Thioredoxine besteht aus der Aminosäuresequenz:



von der die beiden Cystein-Reste aufgrund der Konformation von außen zugänglich sind. (Übersicht: Holmgren 1981). Aufgrund dieser Dithiol/Di-sulfid Gruppe kann das Thioredoxin als Elektronencarrier dienen.



Die Reduktion erfolgt in den photosynthetischen Eukaryonten, Cyanobakterien, und Clostridien Ferredoxin-abhängig durch die Fd:Thioredoxin-Oxidoreduktase, während die Reduktion in E.coli, Hefe, Rhodospirillaceae und tierischen Zellen von der NADP:Thioredoxin-Oxidoreduktase (EC 1.6.4.5) katalysiert wird (Porque et al 1970, Luthmann & Holmgren 1982, Übersicht: Buchanan 1984). Ferner liegen Hinweise vor, daß in pflanzlichen Zellkulturen (Cao et al 1984), in der Grünalge Chlorella (Tsang 1981b) und in Spinatchloroplasten (Soulie et al 1981, Schriek & Schwenn 1984) eine Reduktion der Thioredoxine über NADPH erfolgen kann.

Häufig werden auch isomere Formen des Thioredoxins in einer Zelle oder in einem Organell ausgebildet. Diese Isomere wurden unter anderem aus Cyanobakterien (Yee et al 1981), Hefen (Hall et al 1970) oder aus Chloroplasten höherer Zellen (Schürmann et al 1981, Hutcheson & Buchanan 1983, Nishizawa & Buchanan 1981) isoliert.

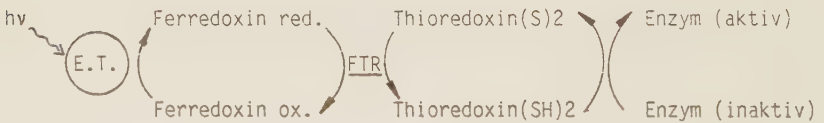
Die Funktion des reduzierten Thioredoxins im Metabolismus der unter-

schiedlichen Zelltypen kann grundsätzlich in zwei Wirkungsbereiche unterteilt werden:

1. Thioredoxin als Regulator von Enzymaktivitäten

2. Thioredoxin als Cofaktor oder Cosubstrat in Enzymkatalysen

Die enzymregulierende Funktion ist bislang fast ausschließlich für bestimmte Enzyme des Chloroplasten beschrieben worden. Thioredoxin reguliert dabei lichtabhängig (durch reduziertes Ferredoxin) die Aktivitäten der 4 Schrittmacherenzyme des Calvinzyklus: Fruktose-1,6-bisphosphatase, Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, NADP:Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und Phosphoribulokinase. Diese Enzyme werden bevorzugt durch Thioredoxin f aktiviert, während die NADP-abhängige Malat Dehydrogenase spezifisch durch Thioredoxin m reguliert wird (Übersicht: Buchanan 1979).



Auch für die Enzyme der assimilatorischen Nitratreduktion in photosynthetischen Zellen liegen Ergebnisse für eine Beteiligung des Thioredoxins als Aktivator von Enzymen vor. In diesem Assimilationsweg konnte gezeigt werden, daß die NH_3 -einbauenden Enzyme Glutamin-Synthetase und GOGAT durch reduziertes Thioredoxin stimuliert wurden (Tischner & Schmidt 1982, Papen & Bothe 1984).

Für die ebenfalls im Chloroplasten lokalisierten Enzyme der photosynthetischen Sulfatassimilation (Schwenn & Trebst 1976) liegen in Hinblick auf eine Enzym-Regulation durch das Thioredoxin-System noch keine Ergebnisse vor.

Die zweite Funktion des Thioredoxins ist die eines elektronenübertra-

genden Cofaktors. Sie wurde bei der Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden durch Reichards Arbeitsgruppe in E.coli entdeckt (Laurent et al 1964, Übersicht: Thelander & Reichard 1979). Hinweise auf diese Funktion wurden inzwischen auch für die Grünalge *Scenedesmus* (Wagner & Follmann 1977), und tierische Zellen (Hopper & Iurlano 1983) beschrieben. Weiterhin dient Thioredoxin als Elektronendonator in der Reduktion von Protein-Disulfiden (Holmgren 1976b) und in der Reduktion von Methioninsulfoxid (Porque et al 1970b). Die Stimulierung der Reduktion von aktiviertem Sulfat (PAPS) in Hefe (Porque et al 1970b), in E. coli (Tsang & Schiff 1976) und in Cyanobakterien (Wagner et al 1978) führten zu der Hypothese, daß Thioredoxin in der assimilatorischen Sulfatreduktion als Cofaktor beteiligt ist. Dabei soll das Thioredoxin die Sulfatgruppe vom PAPS übernehmen und durch intramolekularen Elektronentransfer zu Sulfit reduzieren:



Die Thioredoxin-abhängige PAPS-Reduktase und ihr Zwischenprodukt S:Sulfo-Thioredoxin konnten jedoch bisher noch nicht isoliert werden (Übersicht: Siegel 1975, Schiff & Fankhauser 1981).

Bei Grünalgen (*Chlorella spec.*) und höheren Pflanzen soll nach Ergebnissen von Schmidt (1972a,b 1973) ein niedermolekulares Carrierprotein die Rolle des Thioredoxins übernehmen, wobei im Unterschied zu Bakterien und Hefen APS als Sulfatgruppendonor dient.



Im Vergleich zu diesen Organismen findet keine intramolekulare Reduktion statt, so daß das Sulfit in gebundener Form als $\text{CarS:SO}_3\text{H}$ vorliegt (Schmidt 1973, Abrams & Schiff 1973) und in dieser Form auch zu CarS:SH reduziert werden soll (Schmidt 1973). Proteingebundener Sulfitschwefel in Form eines Bunte Salzes ($\text{RS:SO}_3\text{H}$) ist wiederholt beschrieben worden (Ashai 1964, Schwenn 1970, Schmidt & Schwenn 1971, Schmidt 1972, Abrams & Schiff 1973, Wilson & Bierer 1976), wobei seine Rolle als Intermediärprodukt in der Sulfatassimilation höherer Pflanzen aufgefaßt wird (Übersicht Schwenn & Trebst 1976). Wie bei den bakteriellen Enzymsystemen ist die Charakterisierung des Sulfat-übertragenden Enzyms ("APS-Sulfotransferase) und das Sulfitcarrier-Molekül nicht ausreichend. Diese Einschränkung gilt ebenso für die Identifizierung des Carrier-Moleküls aus Pflanzen und Algen. Sie wurden besonders deutlich in den unterschiedlichen Angaben zum MG des Carrier proteins (" CSSO_3H ": Ashai 1964; " XSSO_3H ", app. MW 6k: Schwenn 1970, Schmidt & Schwenn 1971; " CarSO_3H " app. MW 1.2k: Abrams & Schiff 1973; " GSSO_3H " MW 397: Tsang & Schiff 1978). Unklar bleibt darüberhinaus, ob " $\text{CarS:SO}_3\text{H}$ " als struktureller Bestandteil nach dem Beladen mit der Sulfatgruppe am APS-Sulfotransferase-Molekül verbleibt, oder sich als diffusibles, niedermolekulares Protein von der APS-Sulfotransferase ablösen soll und dann als Substrat für die "Thiosulfonat-Reduktase" dienen kann (Schmidt 1973).

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb die Enzyme, die zur Bildung des Sulfitschwefels notwendig sind, aus *Chlamydomonas reinhardtii*, aus *E.coli* und *Saccharomyces cerevisiae* weitgehend angereichert und auf die Abhängigkeit vom Thiothionin als möglichen Elektronendonator oder Sulfit-carrier untersucht. Dabei sollte durch den Vergleich der Reaktionswege in diesen drei Organismen die Voraussetzungen für die Hypothese eines mikrobiellen "PAPS-Reduktase"- und des Pflanzen-spezifischen "APS-Sulfotransferase"-Weges überprüft werden. Wegen der dualen Funk-

tion des Thioredoxins als Cofaktor in Enzymkatalysen und als Aktivator von Enzymen mußten darüberhinaus die beteiligten Enzyme des Sulfatstoffwechsels auf ihre Aktivierbarkeit durch Thioredoxin untersucht werden. Bei dem Vergleich dieser Funktion des Thioredoxins sollte geklärt werden, ob die Enzymregulation nur bei den phototrophen Eukaryonten und Cyanobakterien verwirklicht ist, oder ob generell im Sulfatstoffwechsel von Bakterien, Pilzen und Grünalgen die Aktivität einzelner Enzyme durch Thioredoxin reguliert wird.

2. ERGEBNISSE

2.1 Thioredoxin: Isolierung, Nachweis und Eigenschaften

Thioredoxine werden mithilfe spezifischer Indikatorreaktionen nachgewiesen. Bei pflanzlichen Thioredoxinen werden dazu die NADP-abhängige Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.82) spezifisch für Thioredoxin m) und die Fruktose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11, spezifisch für Thioredoxin f) verwendet (Wolosiuk et al, 1980). Bei bakteriellen Thioredoxinen werden als Standardnachweis die Ribonukleotid Reduktase (EC 1.17.4.1) (Thelander & Reichard 1979) sowie die PAPS-Reduktase (Tsang & Schiff 1976) eingesetzt.

Die in der Literatur häufig verwendete Methode zur Isolierung von Thioredoxinen (Buchanan & Wolosiuk 1976) entfernt den Großteil des Zellproteins durch eine Säurepräzipitation (Ameisensäure pH 4.5 bis 5.0), wobei die vergleichsweise sauren Thioredoxine im Überstand bleiben. Nach Dialyse und Chromatographie an DEAE-Zellulose erfolgt die weitere Reinigung spezifisch für die einzelnen Organismen nach den Angaben aus der Literatur (Thioredoxin f und m aus Spinat nach Schürmann et al 1981, Thioredoxin I und II aus Hefe nach Porque et al 1970b und Thioredoxin aus *E. coli* nach Tsang 1981a, Methoden, Teil: 5.5).

Für die Untersuchung der Enzyme der Sulfat-Assimilation wurden diese Thioredoxine weiter gereinigt. Dabei zeigte sich, daß mithilfe der Chromatofokussierung an PBE 94 (siehe Methoden, Teil 5.5) eine größere Homogenität erreicht werden konnte. Zusätzlich wurde bei dieser Methode der apparente pI der Proteine bestimmt (Abbildung 1). So konnten durch dieses Verfahren erstmals aus *C. reinhardtii* zwei Thioredoxin-Aktivitäten (Fraktion I und II, Abbildung: 1) nachgewiesen werden.

Die Funktion von Thioredoxin f als Enzym-Aktivator wurde am Beispiel der plastidären Fruktose-1,6-bisphosphatase überprüft. Dazu wurde die Aktivierung des Enzyms in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration (Buchanan et al. 1976) gemessen. Für das nach Chromatofokussierung isolier-

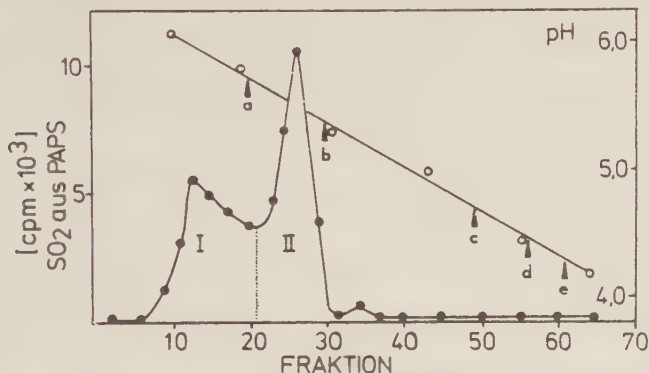


Abbildung 1: Auftrennung der Thioredoxine aus *C. reinhardtii* durch Chromatofokussierung an PBE 94; a) Thio f (Spinat), b) Thio m (Spinat), c) Thio II (Hefe), d) Thio (E.coli), e) Thio I (Hefe)

te Thioredoxin f aus Spinat wurde die in der Literatur beschriebene Aktivierung der Fruktose-1,6-bisphosphatase bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen (0.5 mmol/l) ebenfalls beobachtet (Tabelle 1). Eine weitere

Faktoren im Ansatz	FP2ase-Aktivität ($\mu\text{mol Pi/mg} \times \text{min}$)	
	Mg^{2+} 5.0 mmol/l	Mg^{2+} 0.5 mmol/l
Dithiothreitol	6.6	0.0
Dithiothreitol + 2.2 μg Thio f	15.0	1.5

Tabelle 1: Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf die Aktivierung der Fruktose-1,6-bisphosphatase aus Spinatchloroplasten durch Thioredoxin f

Reaktionsbedingungen in Material und Methoden

Bestätigung für Thioredoxin f als spezifischen Aktivator der FP2-ase wurde bei der Titration des angereicherten Enzyms mit Thio f erhalten. Die Sättigung des Enzyms mit dem Aktivator folgte einer sigmoiden Kurve (Abbildung 2a), die als charakteristisch für den f-Typ angesehen wird (Schürmann et al 1981). Zusammen mit der Spezifität für die FP2ase wurden diese Eigenschaften als ausreichend für die Identität des verwendeten Thioredoxins als Thio f betrachtet.

Die NADP-abhängige Malatdehydrogenase (NADP-MDH) aus Chloroplasten hat in der Aktivierung durch Thioredoxine eine geringere Spezifität, daher kann sie als Nachweissystem für Thioredoxine aus verschiedenen Organismen verwendet werden. Im Vergleich zur FP2ase wurde die Aktivität der NADP-MDH durch steigende Mengen an Thioredoxin m hyperbolisch gesteigert (Abbildung 2b).

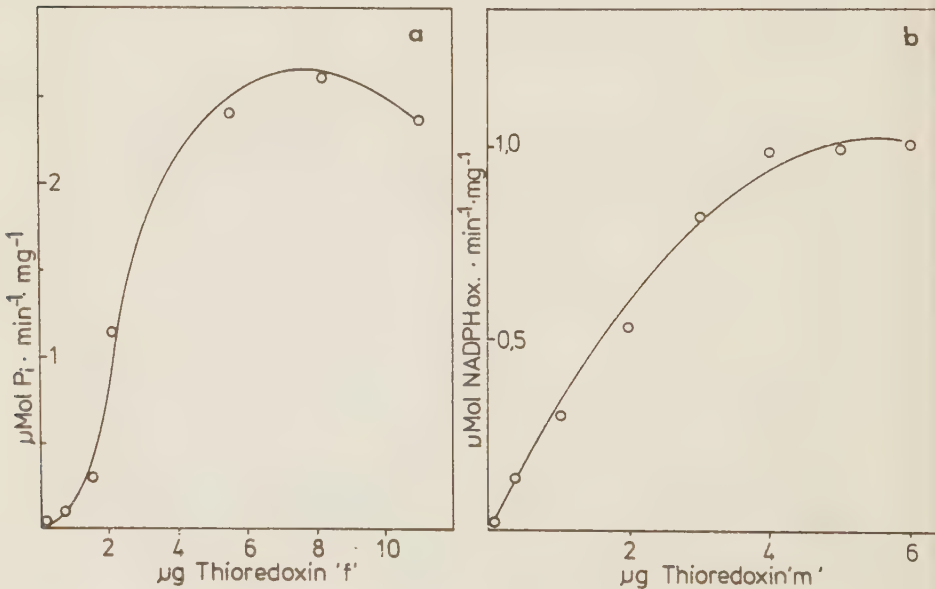


Abbildung 2: Einfluß steigender Mengen Thioredoxin auf die katalytischen Aktivitäten von Fructose-1,6-bisphosphatase (a) und NADP abh. Malatdehydrogenase (b) aus Spinatchloroplasten

Reaktionsbedingungen: siehe Methoden Teil 5.6a&b

Da bei der NADP-MDH aus Pflanzen das homologe Thioredoxin durch die Thioredoxine aus *E. coli* und Hefe in der Aktivierung ersetzt werden konnte, wurde die Stimulierung der MDH-Aktivität als quantitatives Maß für die Menge an Thioredoxin definiert. Die Menge an Thioredoxin, die

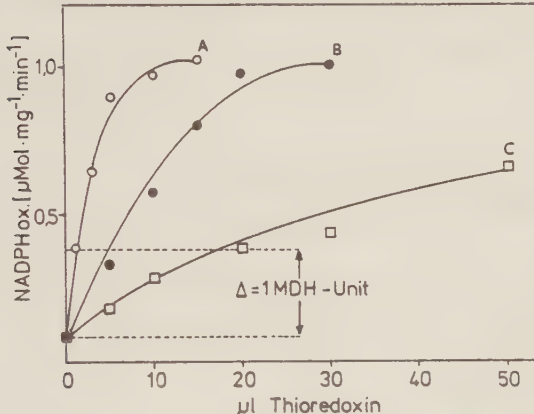


Abbildung 4: Aktivierung der NADP-MDH durch steigende Konzentrationen an Thioredoxin aus *E.coli* (A, 1 mg/ml), Spinat m (B, 0.1 mg/ml) und Hefe I + II (C, 2.3 mg/ml)

Reaktionsbedingungen: Methoden 5.6b

in diesem Testsystem eine Steigerung der Rate um $0.3 \mu\text{mol NADPH ox/mg MDH} \times \text{min}$ hervorrief, wurde als 1 "MDH aktivierbare Unit Thioredoxin" (im Text MDH-Unit) bezeichnet. Diese Normierung erlaubte nun den Vergleich verschiedener Thioredoxine untereinander, ohne daß dabei die Proteinkonzentration der unterschiedlichen Fraktionen berücksichtigt werden mußte (Abbildung 4).

Die Funktion von Thioredoxin als Cofaktor wurde mithilfe der PAPS-Reduktase aus *E.coli* (cf Tsang 1981) untersucht (Methoden, Teil: 5.6c) Mit dieser Reaktion wurden neben dem homologen Thioredoxin auch die

Thioredoxine aus Spinat (m und f) und *C. reinhardtii* (I +II) sowie aus Hefe (II) erfaßt (Abbildung 5). Dabei wurde deutlich, daß in den heterologen Reaktionssystemen mit Thioredoxin m 80 % der Aktivität des homologen Systems erzielt werden konnte. Thioredoxin f aus Spinat wies in der PAPS-Reduktase nur 20 % der Aktivität des Kontrollansatzes auf. Dieses Enzym zeigt daher, ähnlich wie die NADP-MDH, eine größere Spezifität für m-Typ Thioredoxine auf.

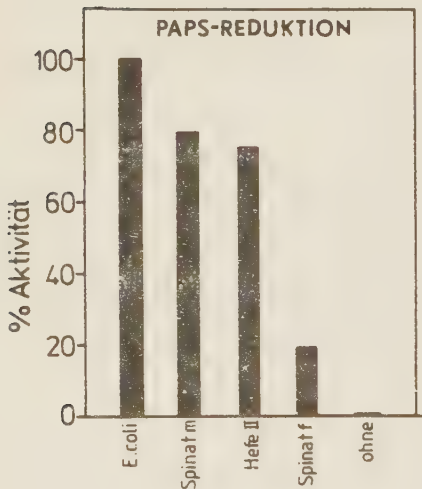


Abbildung 5:

Einfluß heterologer Thioredoxine (DTT-reduziert) auf die Aktivität der PAPS-Reduktase aus *E.coli*

Reaktionsbedingungen: siehe 5.6c

PAPS-Reduktase: 75 µg, Thioredoxin:

2 MDH Units

Die hier vorgestellten Reaktionen bestätigen zunächst die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Thioredoxine und Indikatorenzyme. In Ergänzung zeigte sich, daß in der Reaktion der PAPS-Reduktase und NADP-MDH die Thioredoxine vom Typ m weitgehend austauschbar waren. Im Fortgang der Arbeit wurden die isolierten Indikatorenzyme und Thioredoxine zur Charakterisierung Thioredoxin-abhängiger Reaktionen in der assimilatorischen Sulfatreduktion eingesetzt.

2.2 Thioredoxin als Aktivator

2.2.1 Einfluß von Thioredoxin auf Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion in vitro

Für eine Beteiligung des Thioredoxins bei der photosynthetischen Assimilation von anorganischem Sulfat wurden bislang nur in Cyanobakterien Hinweise erhalten. In diesem Fall scheint das Molekül bei der Reduktion von aktiviertem Sulfat zu Sulfitschwefel beteiligt zu sein (Schmidt 1981, 1977b). Da für höhere Pflanzen und Algen dazu noch keine Ergebnisse vorliegen, wurde der Einfluß des Thioredoxins auf die bekannten Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion :

- 1) ATP-Sulfurylase (EC 2.7.7.4)
- 2) anorganische Pyrophosphatase (EC 3.6.1.1)
- 3) APS-Kinase (EC 2.7.1.25)
- 4) O-Acetyl-L-serinsulfurylase (EC 4.2.99.8)

aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* in vitro untersucht. Dazu wurden die teilweise hochangereicherten Proteinfractionen mit DTT-reduziertem Thioredoxin f zunächst vorinkubiert und anschließend ihre Aktivität bestimmt. Dabei ergaben sich Hinweise, daß von den untersuchten Enzymen nur die APS-Kinase eine Aktivierung durch Thioredoxin f erfuhr. Im Fall der übrigen Enzymaktivitäten war hingegen keine wesentliche Veränderung in der Rate erkennbar (Tabelle 2). Ein Enzym, das aktiviertes Sulfat zu Sulfit reduziert, ist bislang noch aus keinem Organismus isoliert worden. Untersuchungen in Hinblick auf eine Beteiligung des Thioredoxins bei dieser Reaktion sind im zweiten Abschnitt des Kapitels beschrieben. Für einen Einfluß von Thioredoxin auf die Ferredoxin abhängige Sulfitreduktase (EC 1.8.7.1) liegen keine Daten vor.

Enzymfraktion	enzymatische Aktivität		
	Kontrolle	+ Dithiothreitol	+Dithiothreitol + Thio f (5 µg)
1.) ATP- Sulfurylase (nmol ATP/mgxmin)	45	42	48
2.) anorg. PPase (µmolPi/mgxmin)	7.6	5.0	6.0
3.) APS-Kinase (nmolPAPS/mgxmin)	<u>21</u>	<u>43</u>	<u>85</u>
4.) OAS-Sulfurylase (nmolCystein/mgxmin)	400	420	440

Tabelle 2: Einfluß von Thioredoxin f aus Spinatchloroplasten auf die Enzymaktivitäten von ATP-Sulfurylase (1), anorganischer Pyrophosphatase (2), APS-Kinase (3) und O-Acetylserin-Sulfurylase (4) aus *C.reinhardii*

2.2.2 APS-Kinase aus *C.reinhardii*

2.2.2.1 Reinigung des Enzyms

Die erhaltenen Hinweise zur Regulierbarkeit der APS-Kinase machten es notwendig, das Enzym in größerer Menge zu reinigen. Wegen der geringen Ausbeute eignet sich die Methode nach Jender und Schwenn (1984) nicht, so daß ein anderes Verfahren für diesen Zweck entwickelt wurde (siehe Methode 5.1c). Der Proteinaufschluß wurde nach Ammonsulfatfällung an einem Molekularsieb entsalzt und an Blue-Sepharose CL-6B chromatographiert. Da es sich bei der APS-Kinase aus *C.reinhardii* um ein SH-Enzym handelt (Jender & Schwenn 1984), konnte diese Eigenschaft ausgenutzt werden, das Enzym durch kovalente Bindung an eine aktivierte Thiol-Sepharosematrix hoch anzureichern (Tabelle 3).

Schritt	Protein (mg)	spez.Aktivität (nmol/mgxmin)	Anreicherung (xfach)	Ausbeute (%)
B10-GEL P2	1050	0.07	1	100
Blue-Sepharose	45	8.1	115	50
Akt.SH-Seph.	2.7	50.0	714	18.4

Tabelle (3): Reinigung der APS-Kinase aus *C.reinhardtii* (75 Gramm Frischgewicht);

Einzelheiten. siehe Methoden Teil 5.1c

2.2.2.2 Kinetik der Enzymaktivierung

Das Ausmaß einer Thioredoxin-abhängigen Enzymaktivierung ist in vitro unter anderem abhängig von der Dauer der Vorinkubation des Enzyms mit seinen Effektoren, der Konzentration und Spezifität des Aktivators sowie vom Ionenmilieu und dessen pH (Schürmann & Wolosiuk 1978 , Schürmann et al. 1980). Der Einfluß dieser variablen Parameter auf die Reaktionsgeschwindigkeit der APS-Kinase wurde daher untersucht.

Dazu wurden zunächst im Vorinkubationsgemisch die Faktoren: Thioredoxin f, Mg^{2+} und das Reduktionsmittel variiert. Wie aus der Tabelle 4 hervorgent, zeigte sich, daß nicht nur das Dithiol DTT einen aktivierenden Einfluß hatte, sondern auch das Monothiol GSH, das zu einer Verdopplung der Rate führte. Der positive Einfluß der SH-Verbindungen auf die Aktivität des Enzyms konnte durch Zugabe von Thioredoxin f noch einmal verdoppelt werden. Ebenso erwies sich Thioredoxin f auch in Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen als Aktivator des Enzyms.

Faktoren im Ansatz	PAPS nmol/Ansatz (%)	
Komplett	74	100
minus Mg^{2+}	11.5	14
minus DTT	8.1	11
minus Thio f	36.4	49
minus Mg^{2+} , DTT, Thio f	3.6	5
minus DTT, + GSH	30.1	40
minus Thio f + GSH	16.6	21

Tabelle 4: Aktivierung der APS-Kinase aus *C.reinhardii* durch Thio f

Reaktionsbedingungen: Imidazol-HCl 25 mmol/l (pH 6.8), $MgCl_2$ 2 mmol/l, DTT bzw. GSH 5 mmol/l, ATP 30 μ mol/l, APS 4.4 μ mol/l (spez.Akt. 95.000 cpm/nmol), APS-Kinase 1.5 μ g und Thio f 3.0 μ g in einem Volumen von 250 μ l. Vorinkubation: 30' 30°C; Inkubation: 7' 30°C (mit APS gestartet)

Wurde die Dauer der Vorinkubation des Enzyms mit DTT und Thioredoxin f verändert, so ergab sich eine Abhängigkeit der Aktivitätszunahme von der Zeit (Abbildung 5). Die Aktivierungsphase war nach einer Vorinkubationsdauer von 30 Minuten nicht mehr linear. Diese Vorinkubationszeit wurde für die Aktivierung (400 %) der APS-Kinase als ausreichend betrachtet.

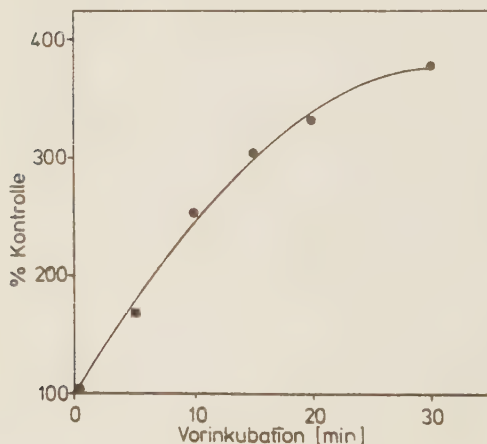


Abbildung (5):

Zeitlicher Verlauf der durch Thio f aktivierten APS-Kinase aus *C.reinhardii*

Reaktionsansätze siehe Tabelle 4

Nach einer Vorinkubation (5 min) des Enzyms mit Thioredoxin f und DTT wurde die Enzymkinetik der APS-Kinasereaktion aufgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Vorinkubation des Enzyms in Gegenwart von DTT und Thio f zu einer Anfangsrate von 80 nmol/mgxmin führte. Dieses war im Vergleich zur Vorinkubation des Enzyms mit DTT allein eine Steigerung um 240 %. Verglichen mit dem Enzym, das nicht in Gegenwart des Thiols vorinkubiert worden war, konnte durch reduziertes Thio f eine Zunahme der PAPS-Bildung um über 600% erzielt werden (Abbildung 6).

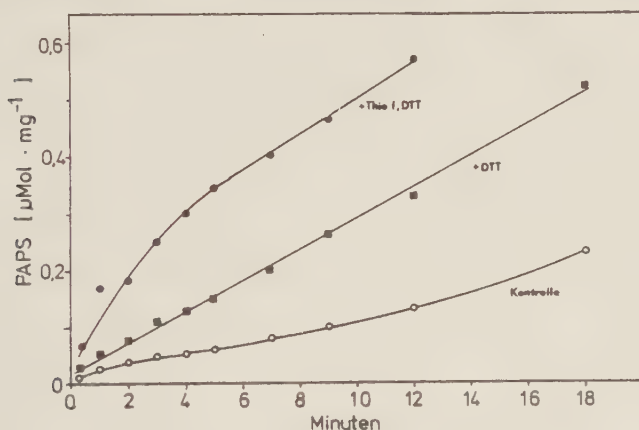


Abbildung 6: Reaktionskinetik der APS-Kinase aus *C. reinhardtii*

Reaktionsansätze wie in Tabelle 4; Vorinkubation 10 min

Untersuchungen zur Spezifität der APS-Kinase in Hinblick auf die beiden Thioredoxine f und m sollten anhand von Titrationskurven durchgeführt werden. Wurde die APS-Kinase in Gegenwart von Thio f vorinkubiert, so waren 2 µg ausreichend, eine Sättigung des Enzyms zu bewirken. Mit steigenden Mengen an Thioredoxin m konnte auch bei zehnfach höheren Konzentrationen keine Sättigung erzielt werden (Abbildung 8). Die Titrationskurve mit Thioredoxin f besaß eine sigmoide Form, steigende Mengen an Thioredoxin m führten zu einem hyperbolischen Verlauf.

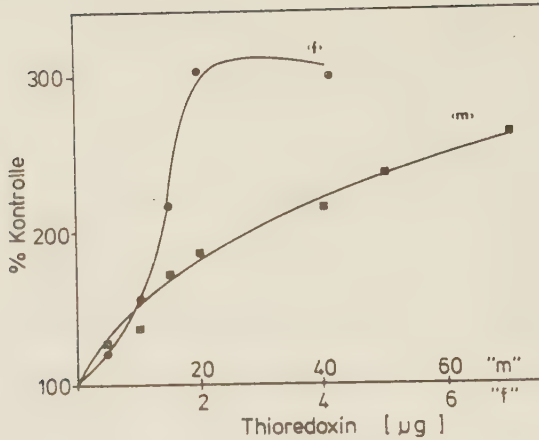


Abbildung 7: Sättigung der APS-Kinase durch Thioredoxin f und m
Reaktionsansätze wie in Tabelle 4; Vorinkubation : 5 Minuten

Da die Aktivierung der FP2ase aus Chloroplasten durch Thioredoxin f in vitro abhängig von der Konzentration an Mg^{2+} -Ionen ist (Schürmann & Wolosiuk 1978), wurde die Wirkung des zweiwertigen Metallions auf die Thioredoxin-abhängige Aktivierung der Kinase ebenfalls untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Aktivierung des Enzyms unabhängig von der Mg^{2+} Konzentration des Vorinkubationsgemisches war (Abbildung 8). Das Konzentrationsoptimum konnte im Bereich von 0.2 - 0.3 mmol/l Mg^{2+} ermittelt werden.

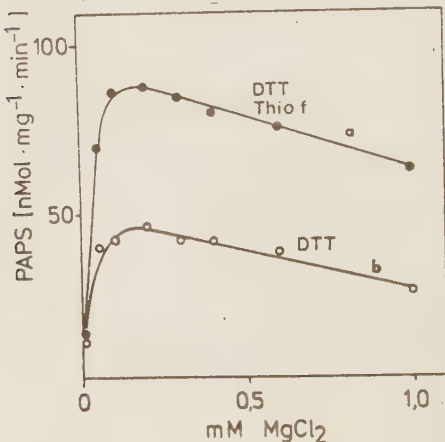


Abbildung 8: Einfluß der Mg^{2+} -Konzentration auf die Thio f abhängige Aktivierung der APS-Kinase aus *C.reinhardtii*.

Reaktionsansätze wie in Tabelle 4

Die vorangegangenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß durch die Thioredoxin-abhängige Aktivierung die Reaktionsgeschwindigkeit (Vapp.) der APS-Kinasereaktion um ein vielfaches gesteigert werden konnte. Wurde die Konzentration an Thioredoxin f bei zwei unterschiedlichen APS-Konzentrationen erhöht, so fiel auf, daß der aktivierende Effekt vor allem bei höheren Substratkonzentrationen (Abbildung 9, Kurve a) stärker ausgeprägt war. Die Stimulierung der PAPS-Bildung unter hohen APS-Konzentrationen ist deshalb bemerkenswert, da in diesem Konzentrationsbereich eine Substrathemmung durch APS einsetzt (Renosto et al. 1984, Jender & Schwenn 1984).

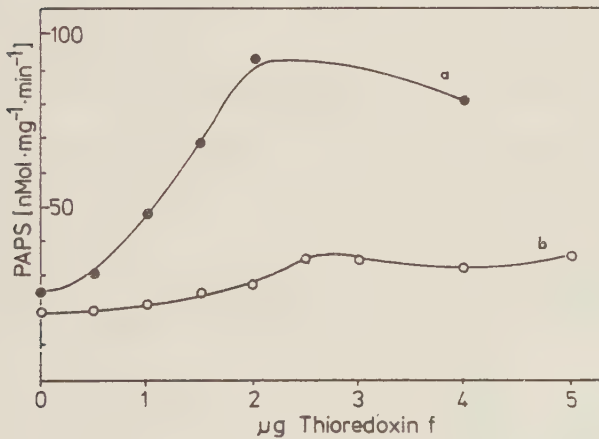


Abbildung (9): Einfluß der Substratkonzentration auf die Aktivität der APS-Kinase: (a) ATP 300, APS 8.8 µmol/l; (b) ATP 30, APS 4.4 µmol/l

Reaktionsansätze siehe Tabelle 4

2.2.2.3 Regulation der APS-Kinase Aktivität in vitro

Die physiologische Bedeutung einer Stimulierung der Enzymaktivität durch reduziertes Thioredoxin könnte bei photosynthetisch aktiven Algen in der Koordination der energieaufwendigen Aktivierung und Reduktion des Sulfates liegen. Da die Enzymaktivierung die APS-Kinase im Licht nur "anschaltet", wurde nach einem Mechanismus gesucht, der die umgekehrte Funktion übernimmt und damit das Enzym im Dunkeln durch Desaktivierung "abschaltet". Als möglicher Angriffsort für eine solche Regulation kämen exponierte SH-Gruppen in Frage, deren Existenz in der APS-Kinase durch kovalente Chromatographie (siehe 2.2.2.1) bestätigt wurde.

Dazu wurde das Enzym in Gegenwart des physiologischen Oxidationsmittels GSSG vorinkubiert. In Ergänzung wurde das artifizielle Oxidationsmittel DCPIP als Inhibitor ebenfalls eingesetzt. Diese Behandlung führte zu einer kompletten Desaktivierung der enzymatischen Aktivität (Tabelle 5). Durch anschließende Behandlung mit DTT und Thioredoxin konnte das durch GSSG desaktivierte Enzym wieder zu 86% reaktiviert werden.

Bedingungen während der Vorinkubation	APS-Kinase Aktivität (%)
Kontrolle	100
GSSG 2mmol/l, 10 Minuten	0
DCPIP 2mmol/l, 10 Minuten	0
GSSG 2mmol/l, 10 Minuten, dann:	
DTT 10mmol/l + 10µg Thio f, 15 Minuten	86

Tabelle (5): Reversible Desaktivierung der APS-Kinase durch Oxidationsmittel

Vorbehandlung: siehe Methoden 5.2d; Inkubation wie in Tabelle 4

2.2.3. APS-Kinase aus *E.coli*

Die Ergebnisse zur Regulation der APS-Kinase in *Chlamydomonas* fügen sich in lichtabhängige Regulationsmechanismen der Chloroplasten ein. Dabei kann Thioredoxin als ein lichtgesteuerter Enzymaktivator der APS-Kinase aus *Chlamydomonas* r. betrachtet werden. Hieraus ergab sich die Frage, wie die APS-Kinase bei nicht photosynthetisch aktiven Organismen (*E.coli*, *Sacch. cerevisiae*) reguliert wird. Aus dem Vergleich des Enzyms der Grünalge *Chlamydomonas* mit einem nicht-photosynthetischen Prokaryonten sollten Hinweise erhalten werden, ob die Thioredoxin-abhängige Aktivierung der APS-Kinase ein generelles Regulationsprinzip darstellt oder nur spezifisch in den photosynthetischen Organismen ausgeprägt ist.

2.2.3 Reinigung und molekulare Eigenschaften des Enzyms

a) Reinigung der APS-Kinase aus *E.coli*

Da die APS-Kinase aus einem Bakterium wie *E.coli* bislang noch nicht beschrieben worden war, wurde das Enzym zunächst hoch angereichert. Die APS-Kinase konnte durch Affinitätschromatographie an Blue-Sepharose CL-6B mit einer über 400fachen Anreicherung aus dem entsalzten Rohextrakt separiert werden (Tabelle 6). Bei diesem Schritt zeigte sich eine Zunahme der Enzymaktivität, die entweder auf die Entfernung eines Inhibitors oder auf eine Aktivierung des Enzyms zurückführbar sein kann. Nach einer Gelchromatographie an Sephacryl S300 schloß sich eine Chromatofokussierung im absteigenden pH-Gradienten (pH 6 - 5) an (siehe Methoden 5.1). Das gesamte Verfahren erlaubte eine über 3000fache Anreicherung des Enzyms innerhalb von 3-4 Tagen.

b) Molekulare Eigenschaften des Enzyms

Mithilfe der Gelfiltration an einem kalibrierten Gel des Typs Sephacryl S300 konnte eine APS-Kinase Aktivität als einzelner Elutionsgipfel im Molekulargewichtsbereich von 85 k erhalten werden (Abbildung 10).

Schritt	Protein (mg)	spez.Aktivität (nmol/mgxmin)	Anreicherung (xfach)	Ausbeute (%)
BIO-GEL P2	13.230	0.16	1	=100
Blue-Seph.	78	75	468	276
S 300	40	86	540	162
PBE 94 (6-5)	4	614	3837	107

Tabelle (6): Reinigung der APS-Kinase aus E.coli (200 Gramm Zellen)

Einzelheiten siehe Methoden 5.1a

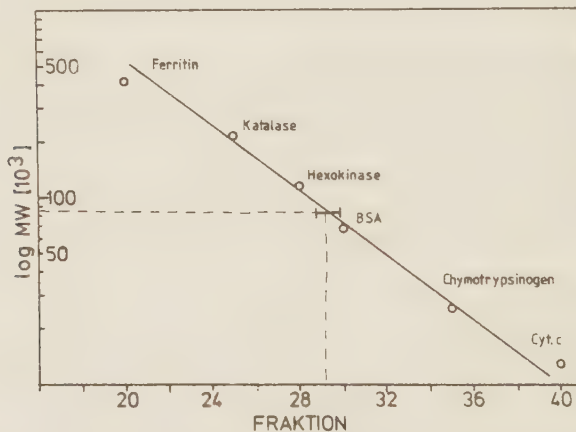


Abbildung 10: Chromatographie der APS-Kinase aus E.coli an Sephacryl S 300 (2 x 53 cm) in Imidazol-HCl 50 mmol/l (pH 7.4); Fluß : 0.2 ml/min

Das Enzym wies einen isoelektrischen Punkt (pI) von 5.5 auf, der sich annähernd um eine pH-Einheit von der APS-Kinase aus C.reinhardii (pI 6.2) unterschied. Die Bestimmung wurde mittels Chromatofokussierung im

absteigenden pH-Gradienten (7-4 oder 6-5) ausgeführt (Abbildung 11).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab für die annähernd homogene APS-Kinase aus *E.coli* ein apparentes Molekulargewicht von 40 k (Abbildung 12). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der Gelfiltration (Abbildung 10) konnte die APS-Kinase aus *E.coli* als ein homodimeres Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 40 k pro Untereinheit betrachtet werden.

Das Enzym war im gereinigten Zustand nur für kurze Zeit (4-5 Tage) stabil. Der Aktivitätsverlust wurde durch Einfrier- und AuftauprozEDUREN noch zusätzlich beschleunigt.

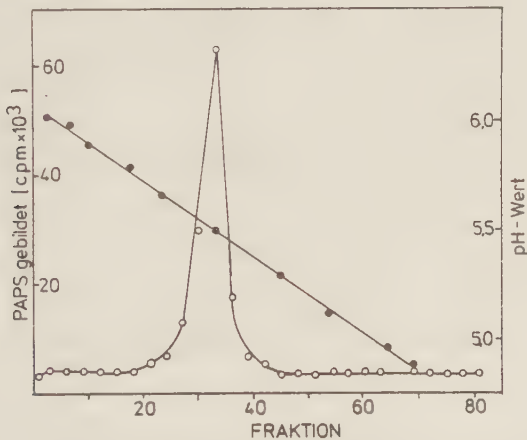


Abbildung (11): Chromatofokussierung der APS-Kinase aus *E.coli* an PBE 94 im pH-Bereich von 6-5

c) pH-Abhängigkeit

Im Vergleich zur APS-Kinase aus *C.reinhardtii*, die im Imidazol-HCl System ein pH-Optimum um pH 6.5-6.8 besaß (Jender und Schwenn 1984), konnte bei *E.coli* durch Erhöhung des pH-Wertes im gleichen Puffersystem ein

weiterer Aktivitätsanstieg nachgewiesen werden. Das pH-Optimum war unter den getesteten Bedingungen bei pH 8.1 noch nicht überschritten (Abbildung 13).

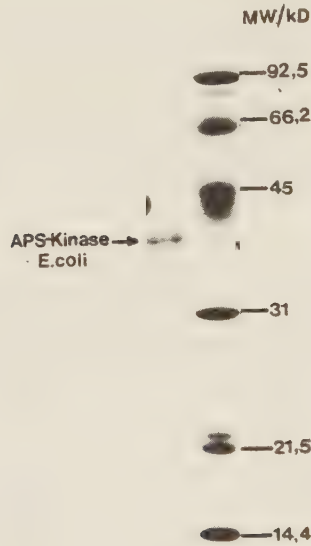


Abbildung (12):

SDS-PAGE der APS-Kinase aus E.coli nach Färbung mit Comassie R-250

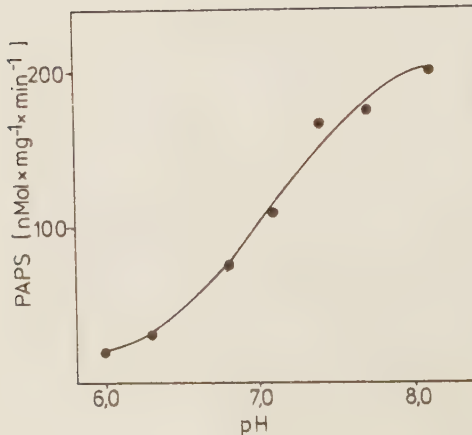


Abbildung (13):

Einfluß des pH-Werts auf die APS-Kinase Aktivität aus E.coli

Reaktionsbedingungen : in Methoden 5.2

2.2.3.2 Einfluß von Thioredoxin auf die APS-Kinase aus E.coli

Auch für die APS-Kinase aus E.coli konnte Thioredoxin als Aktivator-molekül ermittelt werden. Eine Vorinkubation des Enzyms in 20 mmol/l DTT und 7.5 µg Thioredoxin aus E.coli ergab eine Zunahme der enzymatischen Aktivität von 250 % (Tabelle 7). Der Unterschied zur APS-Kinase aus

Faktoren im Reaktionsansatz	Aktivität(nmol/mgxmin)	% Aktivität
Enzym	21	0
Enzym + DTT	29	+ 35
Enzym + DTT + Thioredoxin	75	+253
Enzym + Thioredoxin	53	+147

Tabelle (7): Einfluß von Thioredoxin und DTT auf die APS-Kinase(E.coli)

Reaktionsbedingungen : siehe Methoden 5.2d; Thioredoxin 7.5 µg, APS-Kinase 27 µg

C. reinhardtii bestand darin, daß das bakterielle Enzym nur geringfügig durch DTT stimuliert wurde, wohingegen Thioredoxin in Abwesenheit des Reduktanden bereits zu einer Aktivitätssteigerung von 147 % führte.

Analog zu den Experimenten, bei denen das Enzym der Alge durch Oxidationsmittel (GSSG,DCPIP) deaktiviert wurde (Tabelle 5), sollte auch das Enzym aus E.coli zunächst mit GSSG vorinkubiert werden. Durch eine anschließende Behandlung des Enzyms mit reduziertem Thioredoxin wurden Hinweise auf eine mögliche Regulation über den Redoxzustand des Proteins erwartet.

Eine katalytische Aktivität war kaum mehr nachweisbar, wenn das Enzym in Gegenwart von 10 mM GSSG 10 Minuten lang vorinkubiert wurde (Tabelle 8). Auch eine nachfolgende Behandlung mit 10 mM DTT konnte die katalytische Aktivität nicht reaktivieren. Erst durch die gleichzeitige Anwesenheit von Thioredoxin und DTT konnte das desaktivierte Enzym wieder katalytisch aktiv werden (50 % der Ausgangsaktivität).

APS-Kinase in :	- Thioredoxin	+Thioredoxin
a) H ₂ O	25	66
b) GSSG 10mmol/l, 10 min	1.1	1.8
c) GSSG 10mmol/l, 10 min, dann DTT 10mmol/l, 15 min	0.7	13.2

Tabelle 8: Reaktivierung der APS-Kinase aus E.coli nach vollständiger Desaktivierung durch GSSG (Ansätze in Methoden 5.2d)

Die Ergebnisse lassen bislang den Schluß zu, daß die APS-Kinase aus E.coli ähnlich wie das Enzym aus Chlamydomonas durch den Redox-Zustand reguliert wird. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von Reduktions- und Oxidationsmitteln auf die Aktivität des Enzyms untersucht; in Ergänzung dazu sollten die Aminosäure-Inhibitoren für Cystein (Bromsuccinimid) sowie für Lysin (TNBS) Aussagen über die Beteiligung von speziellen Aminosäuren bei der Regulation und Katalyse machen.

Wie die Tabelle 9 zeigt, ließ sich generell eine Zunahme der Enzymaktivität nach vorausgegangener Vorinkubation mit Reduktionsmitteln feststellen. Dabei wurde durch Thioredoxin die Rate um 166 % erhöht, wenn DTT als Reduktand vorlag. In Gegenwart von reduziertem Glutathion (GSH) steigerte Thioredoxin die Aktivität des Enzyms um 255 %, wohingegen DTT und GSH ohne Zusatz von Thioredoxin nur eine Stimulierung der Rate um 55 bzw. 33 % erzielten. Im Gegensatz zu C.reinhardtii war hier die Thioredoxin-abhängige Aktivierung des Enzyms in Gegenwart von GSH höher als mit DTT (siehe Tabelle 5). β -MSH war unter den SH-Verbindungen als Aktivator unwirksam. Der "feed-back"-Inhibitor Cystein führte nicht zu einer Hemmung der enzymatischen Rate sondern aktivierte als SH-Reagenz das Enzym zu 44 %.

Im Gegensatz zu den Reduktionsmitteln führte die Vorinkubation des Enzyms mit Oxidationsmitteln zu einer Hemmung der Aktivität. Eine vollständige Inhibierung wurde mit GSSG, DCPIP und Ferricyanid erhalten.

Dehydroascorbat sowie FAD ergaben nach Vorinkubation (10 min) mit der bakteriellen APS-Kinase eine 50 %ige Hemmung. Oxidiertes Lipoamid war als Oxidationsmittel des Enzyms nahezu unwirksam.

Der SH-Gruppen spezifische Inhibitor Bromsuccinimid ebenso wie die mit Lysin reagierende 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) desaktivierten das Enzym aus E.coli vollständig. Die hemmenden Wirkung von TNBS auf die APS-Kinase aus E.coli setzte unter den gewählten Reaktionsbedingungen im Konzentrationsbereich von 2 $\mu\text{mol/l}$ ein.

APS-Kinase Aktivität (nmol/mgxmin)			
Aktivierung		Inhibierung	
Vorinkubation (5') in 20 mmol/l		Vorinkubation (10') in 2 mmol/l	
H ₂ O	22.5 (= 100 %)	H ₂ O	27.5 (= 100 %)
GSH	30.0 (133 %)	GSSG	0.0 (0 %)
GSH + Thio	80.0 (355 %)	DCPIP	0.0 (0 %)
DTT	35.0 (155 %)	Ferricyanid	0.0 (0 %)
DTT + Thio	60.0 (266 %)	FAD	13.8 (50 %)
Thio	35.0 (155 %)	Lipoamid	26.8 (97 %)
Ascorbat	30.0 (133 %)	Dehydroascorb.	13.8 (50 %)
L-Cystein	32.5 (144 %)	Bromsuccinimid	0.0 (0 %)
β -MSH	22.5 (100 %)	TNBS	0.0 (0 %)

Tabelle 9: Einfluß von Oxidations- und Reduktionsmittel sowie Inhibitoren auf die Aktivität der APS-Kinase aus E.coli. Ansätze wie 5.2d

Die Ergebnisse zur reversiblen Aktivierung/Desaktivierung der APS-Kinase aus E.coli ergaben analog zu dem Enzym aus *C. reinhardtii* eine Abhängigkeit vom Thioredoxinsystem. Das bakterielle Enzym wird dabei durch Oxidationsmittel "abgeschaltet" und durch reduziertes Thioredoxin wieder "angeschaltet". Am Beispiel eines S-autotrophen Eukaryonten sollte die Regulation der Kinase aus Bäckerhefe untersucht werden.

2.2.4 APS-Kinase aus *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.4.1 Reinigung und molekulare Eigenschaften

a) Reinigung des Enzyms

Arbeiten zur partiellen Reinigung des Enzyms aus Hefe sind beschrieben worden von Robbins und Lipman (1958), sowie von Robbins (1962). Da diese Verfahren nur ungenügende Reinheit des Enzyms für Aktivierungsmessungen liefern, sollte die APS-Kinase mit dem gleichen Verfahren, das sich bereits bei *C.reinhardtii* und *E.coli* bewährt hatte, gereinigt werden (siehe Methoden 5.1b).

Die APS-Kinase konnte aus dem Zellaufschluß durch den chromatographischen Schritt an Blue-Sepharose 180fach angereichert werden (Tabelle 10). Während einer anschließenden Gelfiltration an Sephacryl S300 konnten im Eluat der Säule 2 APS-Kinase Aktivitäten nachgewiesen werden (Abbildung 14), von denen eine im Fraktionierungsbereich der Säule von ca. 200 k und eine zweite im Bereich von 26 k eluierte. Mit beiden Fraktionen war es nicht möglich, eine Chromatofokussierung im pH-Gradienten von pH 7-4 auszuführen, da beide APS-Kinase Aktivitäten im Gegensatz zu *E.coli* und *C.reinhardtii* nicht an den Austausch adsorbiert wurden, sondern im Ausschluß der Säule eluierten. Diese Eigenschaft bewirkte eine zusätzliche Anreicherung des Enzyms um den Faktor 15. Das Verfahren erlaubte es, innerhalb von 3-4 Tagen das Enzym über 3000fach und nahezu homogen anzureichern (siehe Methoden 5.1b).

b) Molekulare Eigenschaften des Enzyms

Zur Bestimmung des isoelektrischen Punktes war eine Chromatofokussierung ungeeignet, da die APS-Kinase im Ausschlußvolumen eluierte. Aus diesem Grund wurde der pI mithilfe der isoelektrischen Fokussierung in einem Agarose-Gel (Agarose-IEF) durch Aktivitätsmessung bestimmt.

Schritt	Protein (mg)	spez.Aktivität (nmol/mgxmin)	Anreicherung (xfach)	Ausbeute (%)
BIO-GEL P2	4230	0.2	1	100
Blue-Sepharose	22	36	180	94
Sephacryl S300	10	50	250	59
PBE 94 (pH7.4)	0.53	770	3850	48

Tabelle 10: Reinigung der APS-Kinase aus Bäckerhefe (500g Zellen)

Einzelheiten in: Methoden Teil 5.1b

Dieses Verfahren ermöglichte es, den pI der APS-Kinase aus Hefe bei pH 7.4 nachzuweisen (Abbildung 15). Wie nach Anfärbung der Proteine mit einem Silbernachweisreagenz zu erkennen war, konnte die APS-Kinase in dieser Proteinfraction als das Protein mit dem höchsten IEP nachgewiesen werden (Abbildung 15c).

Eine anschließende SDS-Gelelektrophorese der Kinase in der 2. Dimension ergab ebenso wie die SDS-PAGE der Präparationen mit der höchsten spezifischen Aktivität eine nahezu homogene Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von 28 k (Abbildung 16).

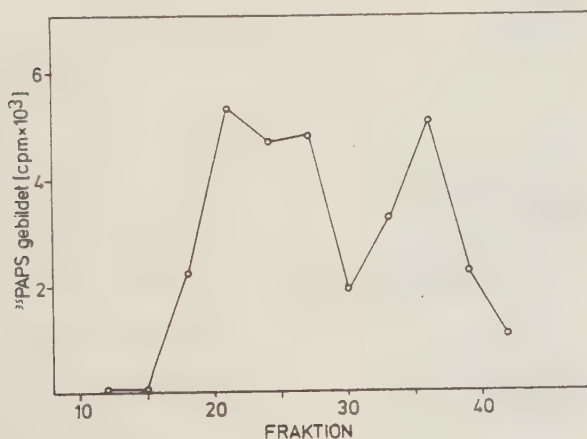


Abbildung 14: Gelfiltration der APS-Kinase aus Hefe an Sephacryl S300

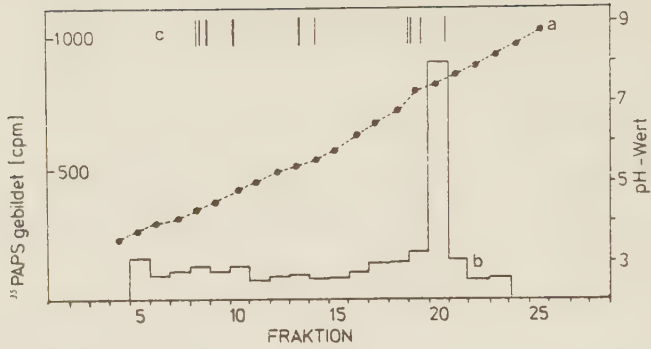


Abbildung 15: Isoelektrische Fokussierung der APS-Kinase in Agarose:

- a) --- :pH-Wert b) — :APS-Kinase Aktivität;
c) Proteinanfärbung mit Silbernachweisreagenz

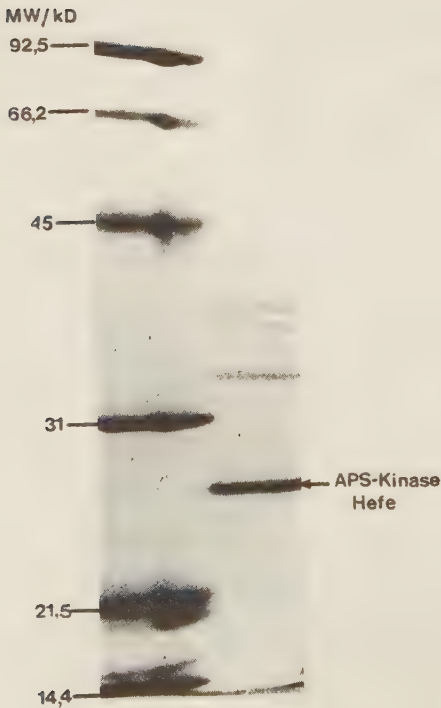


Abbildung 16:

SDS-PAGE der APS-Kinase aus
Bäckerhefe, Färbung mit
Coomassie Brilliant Blue R

Das Vorkommen von exponierten SH-Gruppen am Enzym konnte ausgeschlossen werden, da es trotz vorausgegangener Inkubation mit DTT nicht an aktivierter Thiolsepharose gebunden werden konnte. Das isolierte Enzym konnte nach Passage durch den Polybuffer-Austauscher für mindestens 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Der Aktivitätsverlust betrug unter diesen Bedingungen ca 60 - 70 %.

c) pH-Abhängigkeit

Das Enzym der Hefe besaß im Imidazol-HCl-System ein breites, in den schwach sauren Bereich verschobenes pH-Optimum (Abbildung 17). Bei einem pH-Wert von 8.0 wurde bereits eine 50 %ige Hemmung der Aktivität beobachtet. Ein ähnliches pH-Profil konnte auch für die APS-Kinase aus *Chlamydomonas* im gleichen Puffersystem ermittelt werden (Jender und Schwenn 1984). Demgegenüber ist das pH-Profil des Enzyms aus *E.coli* im Imidazol-System um mehr als eine pH-Einheit in den alkalischeren Bereich um pH 8 verschoben (Abbildung 13).

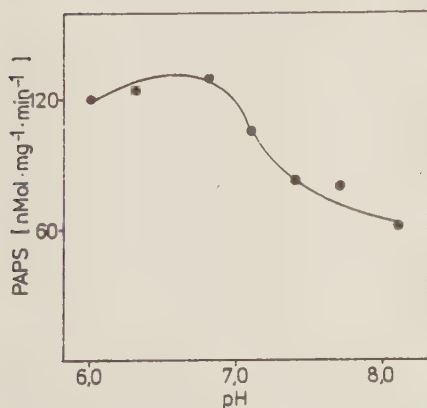


Abbildung 18:

Einfluß des pH-Werts auf die
Aktivität der APS-Kinase aus
Hefe

Reaktionsansätze in Methoden 5.2

2.2.4.2 Einfluß von Thioredoxin auf die APS-Kinase aus Hefe

Das isolierte Enzym wurde in Gegenwart des homologen Thioredoxin II 5 Minuten lang vorinkubiert. Im Anschluß daran wurde die Aktivität des Enzyms sowohl im optisch gekoppelten Test nach Burnell & Whatley (1975) (Abbildung 20) als auch durch Bestimmung des Produktes PAPS nach Schwenn & Jender (1980) (Abbildung 19) gemessen. Dabei zeigte sich, daß auch die APS-Kinase aus Hefe eine deutlich meßbare Aktivitätszunahme nach einer Vorinkubation mit Thioredoxin erfuhr. Der Unterschied zu den beiden bisher charakterisierten Enzymen aus der Alge und dem Bakterium bestand jedoch darin, daß hier die Thioredoxin-abhängige Aktivierung unabhängig vom DTT erschien (Abbildung 19). Durch Zugabe des Protein-faktors konnte die Kontrollrate ($0.6 \mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$) unabhängig vom DTT um den Faktor 3.5 auf $2.2 \mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$ gesteigert werden (Abbildung 19). Im optisch gekoppelten Test konnte nach Vorbehandlung des Enzyms mit Thioredoxin die APS abhängige ADP-Bildung zu Beginn der Reaktion von $1.1 \mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$ auf $2.0 \mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$ gesteigert werden. Im Vergleich zu diesem exponentiellen Reaktionsverlauf blieb die Kontrollrate ($0.8 \mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$) linear (Abbildung 20).

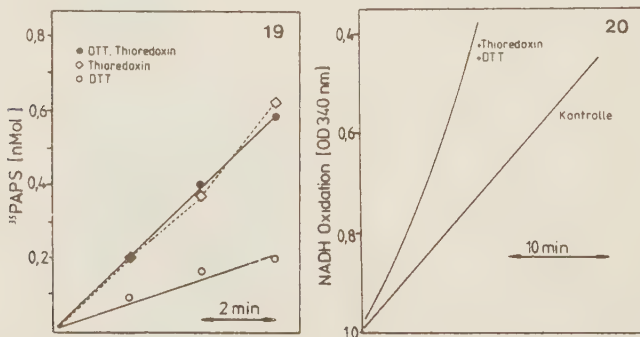


Abbildung 19: Einfluß von Thio II auf die APS-Kinase (HPLC-Verfahren)

Abbildung 20: Einfluß von Thio II auf die APS-Kinase (optisch gekop.)

Reaktionsansätze: siehe Methoden 5.2

Der Vergleich dieser beiden Meßverfahren zur Bestimmung der APS-Kinase Aktivität konnte aufgrund störender Nebenaktivitäten im photometrischen Test erst in einem sehr späten Reinigungszustand des Enzyms gemacht werden. Der Vorteil des optisch gekoppelten Tests liegt darin, daß die Rate kontinuierlich verfolgt werden konnte. Als Nachteil dieses Verfahrens kann eine Limitierung der Reaktion durch die Indikatorenzyme angeführt werden, da die Affinität der APS-Kinase zu ihren Substraten extrem hoch ist. Ferner ist der photometrische Test nur bedingt für Inhibierungsexperimente geeignet.

Um einen näheren Aufschluß über die Art der Aktivierung zu erhalten, sollte das Enzym aus Hefe analog zu den Versuchen bei *C.reinhardtii* und *E.coli* zunächst mit dem Oxidationsmittel GSSG deaktiviert werden, so daß anschließend eine Reaktivierung der katalytischen Aktivität durch reduziertes Thioredoxin erhalten werden konnte (vergl.Tabellen 5 & 8).

APS-Kinase Aktivität (nmol/mgxmin)			
Vorinkubation (5') in 20 mmol/l		Vorinkubation (10') in 2 mmol/l	
H ₂ O	93 (= 100 %)	H ₂ O	97 (= 100 %)
GSH	101 (107 %)	GSSG	64 (66 %)
GSH + Thio	228 (244 %)	DCPIP	0 (0 %)
DTT	89. (95 %)	Ferricyanid	97 (100 %)
DTT + Thio	222 (237 %)	FAD	97 (100 %)
Thio	164. (176 %)	Lipoamid	86 (89 %)
Ascorbat	93 (100 %)	Dehydroascorb.	91 (94 %)
L-Cystein	93 (100 %)	Bromsuccinimid	0 (0 %)
β-MSH	93 (100 %)	TNBS	68 (72 %)
		4-APhMac	0 (0 %)

Tabelle 10: Einfluß von Oxidations- und Reduktionsmitteln sowie Inhibitoren auf die APS-Kinase aus *Saccharomyces cerevisiae*.

Die APS-Kinase der Hefe verhielt sich nach dieser Art der Vorbehandlung deutlich anders in ihrer katalytischen Aktivität als die entsprechenden Enzyme aus Alge und Bakterium, da eine Vorinkubation (5') des Enzyms in Gegenwart von SH-Verbindungen zu keiner signifikanten Erhöhung der Aktivität führte. Nur eine Vorbehandlung mit Thioredoxin resultierte in einer Steigerung der Aktivität. Das gealterte Enzym (die spezifische Aktivität war von 0.8 auf 0.09 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{min}$ gesunken) wies im Gegensatz zu den frischen Präparationen (vergl. Abb.19) ein Thiolbedürfnis bei der Aktivierung durch Thioredoxin auf. Dabei war es unerheblich, ob das Monothiol GSH oder das Dithiol DTT eingesetzt wurde. In beiden Fällen konnte die APS-Kinase Aktivität der gealterten Enzymfraktion um den Faktor 2.4 stimuliert werden.

Unter den getesteten Oxidationsmitteln bewirkte nur DCPIP eine vollständige Inhibierung des gealterten Enzyms. Das physiologische Oxidationsmittel GSSG ergab im Gegensatz zu den Enzymen aus *E.coli* und *C.reinhardtii*, wo es zu 100% inhibierte, für das Enzym der Hefe nur eine 34 %ige Hemmung. Alle übrigen Oxidationsmittel erwiesen sich als wirkungslos. Auch der Lysin-spezifische Inhibitor TNBS brachte die katalytische Aktivität nicht wie bei *E.coli* zum Erliegen, sondern hemmte nur zu 28 % die Aktivität des Enzyms. Erst die SH-Gruppen spezifischen Inhibitoren Bromsuccinimid und das Quecksilbersalz von 4-Aminophenylacetat hemmten das Enzym vollständig. Der I50 von BSI lag unter den gewählten Bedingungen bei 16 $\mu\text{mol/l}$ (Abbildung 21). Trotz dieser Empfindlichkeit gegenüber SH-Inhibitoren fand wie bereits erwähnt, eine Bindung des Enzyms an aktivierter Thiol-Sepharose nicht statt.

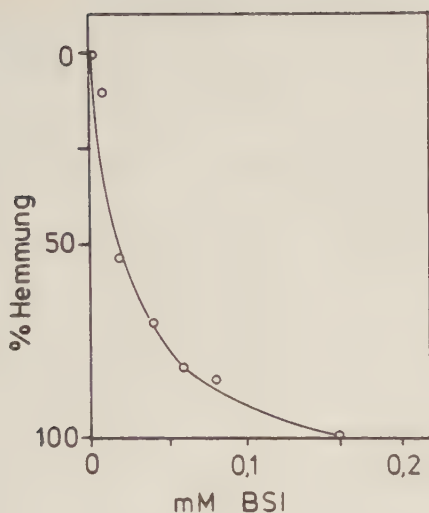


Abbildung 21:

Hemmung der APS-Kinase aus Hefe durch Bromsuccinimid

Ansatz: Imidazol-HCl 50 mmol/l (pH 6.8), $MgCl_2$ 2mmol/l, APS 18 μ mol/l, ATP 200 μ mol/l;

Inkubation: 5'; dann je 100 μ l in 50 μ l Hemmstofflösung

2.2.4.3 Einfluß von ADP auf die APS-Kinase Aktivität

Die vorliegenden Untersuchungen zur Regulation der APS-Kinase aus Hefe sprechen für eine Beteiligung des Thioredoxins als Aktivator der Reaktion. Im Gegensatz zu *E.coli* und *C.reinhardtii* war die Aktivität des Enzyms der Bäckerhefe relativ unabhängig vom Redoxzustand des in vitro-Systems. Aus diesem Grund wurde nach einem regulatorischen Mechanismus gesucht, der über die Produktbildung (ADP) einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms nehmen konnte. Dazu wurde die Aktivität des Enzyms in Gegenwart steigender ADP-Konzentrationen bei verschiedenen, konstant gehaltenen ATP-Konzentrationen bestimmt. Aus der Auftragung der erhaltenen Ergebnisse nach Dixon ($1/v$ gegen I) konnte ADP als kompetitiver Inhibitor für eine Bindung von ATP an das Enzym erhalten werden. Die apparente K_i für ADP lag bei 13 μ mol/l ADP (Abbildung 22) und macht so-

mit eine Produktinhibierung durch ADP in vivo wahrscheinlich.

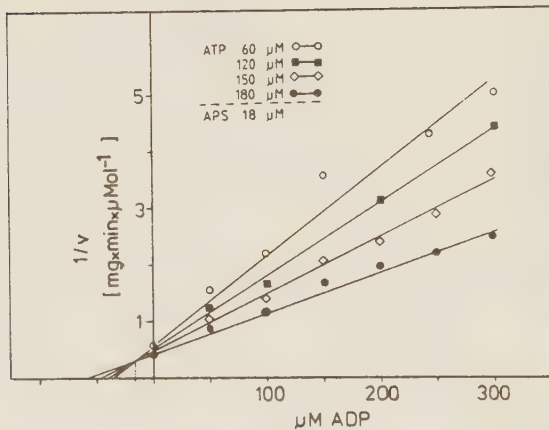


Abbildung 22: Effekt von ADP auf die Aktivität der APS-Kinase aus Hefe
Reaktionsbedingungen: Imidazol-HCl 50mmol/l (pH6.8), MgCl_2 2 mmol/l,
Kinase 4 μg , ^{35}S -APS 18 $\mu\text{mol/l}$, ADP und ATP wie angegeben.

2.2.5 Zusammenfassender Vergleich: APS-Kinase

Eine Gemeinsamkeit aller hier untersuchten APS-Kinasen war die extrem hohe Affinität zu Blue- und Red-Sepharose CL-6B, die es überhaupt erst ermöglichte, die Enzyme selektiv und in extrem kurzer Zeit zu isolieren. Durch diesen Schritt wurden Phosphat- und Sulfatester hydrolysierende Aktivitäten sowie die PAPS-Reduktase der C-heterotrophen Organismen vollständig aus der APS-Kinase Fraktion entfernt. Eine Ausnahme machte das Enzym der Alge, das nur zu 50 % an die Affinitätsmatrix adsorbiert wurde und unter den experimentellen Bedingungen mit einer APS-reduzierenden Aktivität kontaminiert war (vergl. 2.3.2).

Das unterschiedliche Bindeverhalten der Enzyme an aktivierter Thiol-Sepharose, das exponierte SH-Gruppen am Enzym voraussetzt, steht möglicherweise in Zusammenhang mit dem positiven Effekt von Sulfhydrylverbindungen auf die katalytische Aktivität der Enzyme. So konnte das Enzym der Hefe weder an SH-Sepharose binden noch durch SH-Reagenzien in seiner Aktivität gesteigert werden. Demgegenüber zeigte das Enzym der Alge das umgekehrte Verhalten.

Die apparenten Molekulargewichte der drei Enzyme wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen bestimmt. Dabei konnten für das Enzym der Alge mit 45 k das höchste und für die Hefe mit 28 k das niedrigste Molekulargewicht ermittelt werden. Das Enzym aus *E. coli* wies unter identischen Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von 40 k auf. Da das native Enzym aus *E. coli* mit der Gel-filtration im Molekulargewichtsbereich von 85 k nachgewiesen wurde, kann dieses Enzym als ein homodimeres Protein betrachtet werden.

Im Gegensatz dazu eluierten die Aktivitäten der APS-Kinasen aus Hefe und *C.reinhardtii* unter identischen experimentellen Bedingungen in Molekulargewichtsbereichen, die um ein Vielfaches größer waren als die Molekulargewichte nach SDS-Gelelektrophorese (vergl 2.3.2).

Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte ergab für das bakterielle Enzym einen pI von 5.5, der um 2 pH-Einheiten niedriger lag als der pI der Kinase aus Hefe mit 7.4. Für *C.reinhardtii* konnte der pI von 6.2 bestätigt werden (Jender & Schwenn 1984). Eine zweite APS-Kinase Aktivität aus der Alge konnte im pI-Bereich von 5.9 ermittelt werden (vergl. 2.3.2).

Thioredoxin konnte ohne Ausnahme sowohl im heterologen als auch im homologen System als Enzymaktivator der APS-Kinase in allen drei Organismen gezeigt werden. Dabei scheint der Modus der Aktivierung für das Enzym aus *Saccharomyces* ein anderer zu sein. Durch die Zugabe von Thioredoxin II wurde die apparente Geschwindigkeit der APS-Kinase Reaktion innerhalb der ersten 10 Minuten nach Reaktionsbeginn erhöht (Abbildung 20). Dabei ist die Notwendigkeit für die Anwesenheit eines Reduktionsmittels bei der Aktivierung noch nicht eindeutig geklärt. Exponierte SH-Gruppen konnten für das Enzym aus *Chlamydomonas* nachgewiesen werden, nicht hingegen für die Kinase aus *Saccharomyces*. Essentielle SH-Gruppen existieren in oder an allen drei Enzymen, wie Inhibierungsversuche mit SH-spezifischen Inhibitoren ergaben. Eine generelle Beteiligung von Lysin bei der Katalyse konnte ausgeschlossen werden, da TNBS nur das bakterielle Enzym vollständig hemmte.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Thioredoxin-abhängige Aktivierung der APS-Kinase als ein generelles Regulationsprinzip in den drei untersuchten Organismen betrachtet werden kann.

	APS-Kinase aus		
	E.coli	C.reinhardtii	S.cerevisiae
<u>1.Molgewicht</u>			
SDS-PAGE	40 k	45 k *)	28 k
Gelfiltration	85 k	500, 250, 30 k	200, 30 k
<u>2.isoelektr. Punkt</u>			
Chromatofokuss.	5.5	6.2; 5.9	> 7.0
Agarose-IEF	n.b.	n.b.	7.4
<u>3.Affinität zu Red- & Blue-Sepharose</u>	+	- +	+
<u>4.kovalente Bindung an SH-Sepharose</u>	n.b.	+	-
<u>5.pH-Optimum</u>	> 8	6.8 *)	6.8
<u>6.Aktivierung</u>			
a) Thioredoxin	+ (E.coli)	+ (Spinat f)	+ (Hefe)
b) SH-Reagenzien	+	+	-
<u>7.Inhibierung</u>			
a) APS (Ki)	n.b.	4-5 µmol/l *)	2-3 µmol/l
b) ADP (Ki)	n.b.	70 µmol/l *)	13 µmol/l
c) Bromsuccinimid	+	+	+
d) TNBS	100 %	89 %	28 %
e) Oxidationsmittel			
DCPIP	100 %	100 %	100 %
GSSG	100 %	100 %	34 %
FeCy	100 %	n.b.	0 %

Tabelle 12: Zusammenfassender Vergleich der gereinigten APS-Kinasen

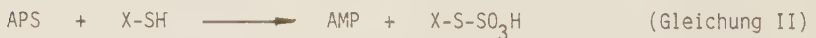
*) aus Jender (1982)

2.3 Thioredoxin als Cofaktor

Im ersten Abschnitt der Ergebnisse wurde gezeigt, daß durch Thioredoxin das Enzym der PAPS-bildenden Reaktion - APS-Kinase - in den drei hier untersuchten Organismen: *E.coli*, *S.cerevisiae* und *C.reinhardtii* aktiviert wurde. Hinweise für eine Beteiligung des Thioredoxins in der Reduktion von PAPS zur Oxidationsstufe des Sulfits konnten in Hefe (Wilson & Bierer 1976), *E.coli* (Tsang & Schiff 1976), einigen Rhodospirillen (Imhoff 1980) und einigen Cyanobakterien (Schmidt 1981) aus der Literatur erhalten werden (Gleichung I):



Unabhängig von diesem Thioredoxinsystem soll die Reduktion von APS in Grünalgen (Tsang 1981) sowie einigen Rhodospirillen (Imhoff 1980) und einigen Cyanobakterien (Schmidt 1981) erfolgen. Für höhere Pflanzen und die Grünalge *Chlorella* wurde ein Mechanismus vorgeschlagen (Abrams & Schiff 1973, Schmidt 1973), bei dem vom APS aus in einer Sulfotransferase-Reaktion das aktivierte Sulfat auf ein niedermolekulares Carrierprotein (X-SH) übertragen wird. Aus dieser Reaktion geht gebundenes Sulfit in Form eines Thiosulfats hervor (Gleichung II).



Da bislang noch kein Enzym isoliert und detailliert charakterisiert worden ist, das aktivierte Sulfat zu Sulfit reduziert, war das Ziel der folgenden Untersuchungen die entsprechenden Proteine aus den drei vorgestellten Organismen zu isolieren und ihre Substratspezifität sowie die entstehenden Produkte zu vergleichen. Dabei wurde die Sulfat-reduzierende Aktivität in Hefe und *E.coli* als "PAPS-Reduktase" (Siegel 1975) und die Aktivität der Alge als "APS-Sulfotransferase" (Schiff und Fankhauser 1981) im weiteren Verlauf der Arbeit bezeichnet.

2.3.1 PAPS-Reduktase Systeme aus Hefe und E.coli

2.3.1.1 Trennung und Reinigung der Teilkomponenten

Die Abbildung 23 stellt das generelle Aufarbeitungsverfahren zur Separierung der Enzyme aus der assimilatorischen Sulfatreduktion von E.coli und Hefe dar (siehe Methoden 5.3).

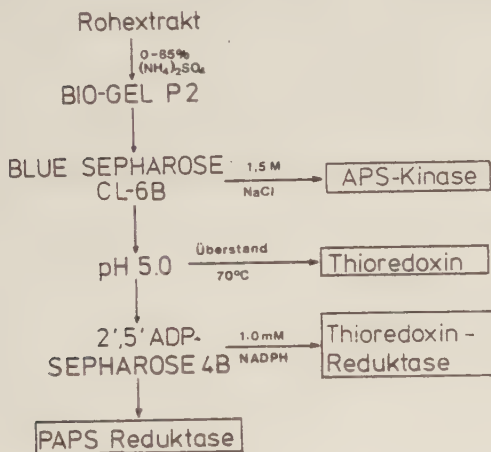


Abbildung 23:

Reinigung der Sulfat-aktivierenden und -reduzierenden Enzyme, sowie das Thioredoxin-System aus einem Zellaufschluß

Einzelheiten in Methoden

Dabei wurde zunächst der Proteinaufschluß konzentriert und entsalzt, bevor die APS-Kinase durch Affinitätschromatographie abgetrennt werden konnte. Dasjenige Material, das nicht an Blue-Sepharose adsorbierte, wurde durch Säurebehandlung präzipitiert. Dieses Sediment enthielt die Thioredoxin-Reduktase und die PAPS-Reduktase und war von der Thioredoxinfraktion des Überstandes vollständig separiert. Durch Affinitätschromatographie an 2',5'ADP-Sepharose 4B konnte die Thioredoxin-Reduktase von der PAPS-Reduktase, die nicht an die Matrix gebunden wurde, getrennt werden.

Die PAPS-Reduktase wurde durch anschließende Gelfiltration an Sephacryl S300, gefolgt von einer kovalenten Chromatographie an aktivierter Thiol-Sepharose (nur für E.coli) hoch angereichert. Zur Entfernung des überschüssigen Thiols erfolgte eine Dialyse gegen Tris-HCL 50mmol/l (pH 7.6).

2.3.1.2 Thioredoxin als Elektronendonator bei der Reduktion von PAPS

a) Bestimmung der K_m für PAPS und Thioredoxin

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten des Enzyms aus *E. coli* für Thioredoxin und PAPS wurde die Konzentration an Thioredoxin bei unterschiedlichen PAPS-Konzentrationen variiert. Thioredoxin wurde durch DTT reduziert gehalten; dadurch konnte eine Limitierung der enzymatischen Reduktion über die Thioredoxin-Reduktase ausgeschlossen werden. Die Reduktion von PAPS zu Sulfit durch die PAPS-Reduktase zeigte sich als vollständig abhängig vom Thioredoxin (Abbildung 24). Dabei führten steigende Mengen an Thioredoxin zu hyperbolisch verlaufenden Sättigungskurven, wobei die erreichte Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) abhängig von der jeweiligen Konzentration an PAPS war.

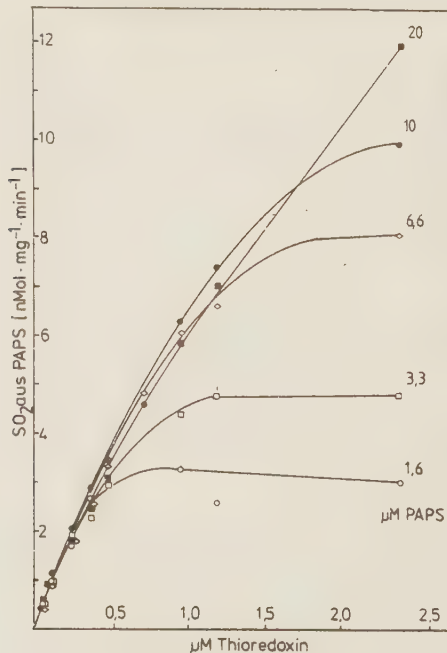


Abbildung 24: Abhängigkeit der PAPS-Reduktase Aktivität von der Konzentration an Thioredoxin bei verschiedenen PAPS-Konzentrationen

Reaktionsbedingungen in Methoden 5.4a

Aus der Darstellung der erhaltenen Meßwerte in doppelt-reziproker Auftragung wurde für das Thioredoxin eine apparente K_m von $1.3 \mu\text{mol/l}$ erhalten (Abbildung 25). Dieser Wert ist 10 mal kleiner als die Konzentration des Thioredoxins in einer E.coli Zelle mit $15 \mu\text{mol/l}$ (Holmgren et al.1978). Im Lineweaver-Burk Diagramm mit PAPS als Substrat (Abbildung 26), ergab sich für die höchste Konzentration an Thioredoxin eine Gerade, aus der für PAPS die apparente Michaelis-Konstante von $8 \mu\text{mol/l}$ erhalten wurde. Bei niedrigen Konzentrationen an Thioredoxin konnte durch steigende Mengen PAPS die Reaktionsgeschwindigkeit nicht erhöht werden. Die Geraden verliefen in diesem Fall parallel zur $1/s$ Achse.

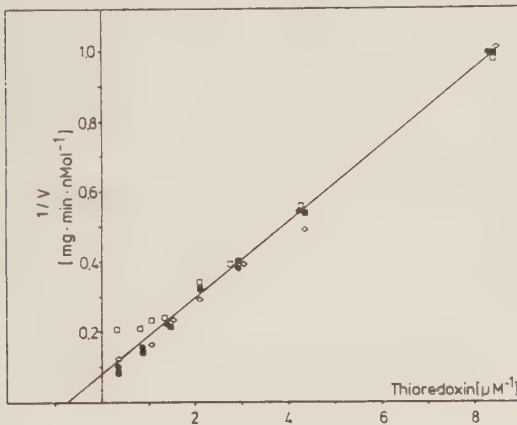


Abbildung 25:
Abhängigkeit der PAPS-
Reduktase Aktivität von
Thioredoxin bei verschie-
denen PAPS-Konzentrationen

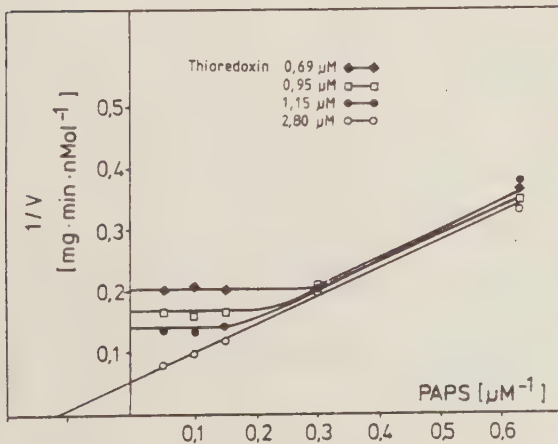


Abbildung 26:
Abhängigkeit der PAPS-
Reduktase Aktivität von
PAPS bei verschiedenen
Thioredoxin-Konzentra-
tionen

b) Kompatibilität mit Thioredoxinen unterschiedlicher Herkunft

Die Bestimmungen der K_m für Thioredoxin haben gezeigt, daß die PAPS-Reduktase aus *E.coli* ein empfindliches Nachweissystem für Thioredoxin darstellt. Im folgenden sollte gezeigt werden, in wie weit heterologe Thioredoxine als Cofaktoren in die PAPS-Reduktase Reaktionen von *E.coli* und Hefe eingehen konnten. Dazu wurden steigende Mengen an Thioredoxin -Units (siehe 2.1) aus *E.coli*, Hefe (I + II) und Spinat (m-Typ) in den PAPS-Reduktase-Test gegeben und anschließend das freigesetzte Sulfid bestimmt. Dabei zeigte sich, daß steigende Mengen an Thioredoxin in der PAPS-Reduktase Reaktion von *E.coli* annähernd gleiche Aktivitäten des Enzyms hervorriefen (Abbildung 27a). Wurden gleiche Thioredoxin-Einheiten zum PAPS-Reduktase Ansatz der Hefe gegeben, so konnte für das Enzym der Hefe eine vollständige Aktivität nur mit dem homologen Thioredoxin, das sich aus einer Mischung von Thioredoxin I und II zusammensetzte, erhalten werden. Die heterologen Thioredoxine aus Spinat und *E.coli* konnten die Aktivität des Enzyms nur zu 20 % rekonstituieren.

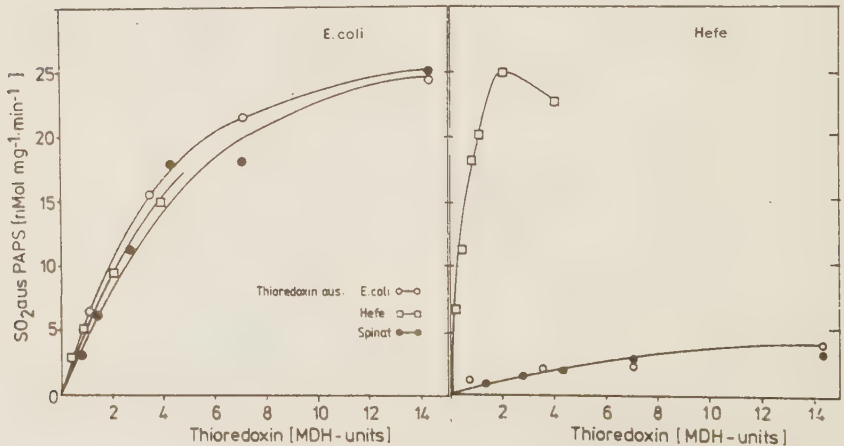


Abbildung 27: Aktivität der PAPS-Reduktase aus *E.coli*(a) und Hefe (b) mit homologen und heterologen Thioredoxinen
Reaktionsansätze: siehe Methoden 5.4a

Eine Trennung der Thioredoxine aus Hefe in Thioredoxin I und II ergab im anschließenden PAPS-Reduktase Ansatz von E.coli ein unterschiedliches Verhalten. Hier erwies sich Thioredoxin II bei der Reduktion von PAPS über dreißig mal aktiver als Thioredoxin I (Abbildung 28).

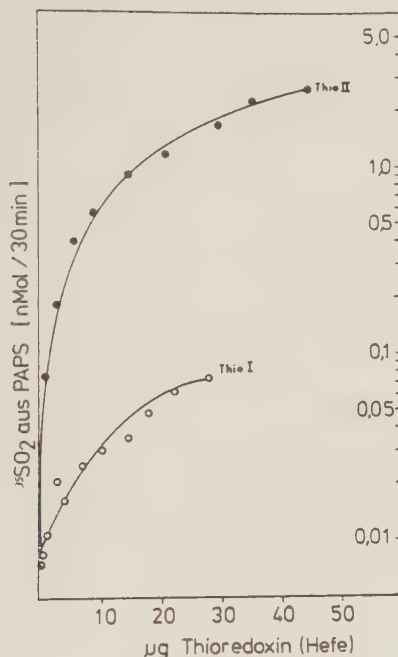


Abbildung 28:

Einfluß von steigenden Mengen Thioredoxin aus Hefe (I ○ und II ●) auf die Aktivität der PAPS-Reduktase aus E.coli

Reaktionsansätze: siehe Methoden 5.4a

Diese Ergebnisse sowie die aus den Experimenten zur Aktivierung der NADP abhängigen MDH aus Spinatchloroplasten (Abbildung 4) weisen darauf hin, daß die Thioredoxine aus E.coli und der m-Typ des Chloroplasten in ihren spezifischen Reaktionen (PAPS-Reduktase & MDH) austauschbar waren, wenn DTT als Reduktionsmittel eingesetzt wurde. Wurde die chemische Reduktion des Thioredoxins durch die enzymatische über die Thioredoxin-Reduktase aus E.coli ersetzt, so konnte nur mit dem homologen Thioredoxin Aktivität erzielt werden (Tabelle 13).

Cofaktor	PAPS-Reduktase Aktivität (nmol SO ₂ / 20 Minuten)	
	<u>DTT</u>	<u>NADPH/Thio-Reduktase</u>
+Thioredoxin (E.coli)	0.34	0.32
-Thioredoxin (E.coli)	0.0	0.0
+Thioredoxin m (Spinat)	0.31	0.0

Tabelle 13: Spezifität der Thioredoxin-Reduktase aus E.coli für das homologe Thioredoxin aus E.coli

Reaktionsbedingungen: siehe Methoden 5.4a und b

c) Einfluß von Oxidationsmitteln und Inhibitoren

Durch Oxidationsmittel wurde die Aktivität der APS-Kinase aus E.coli gehemmt und durch reduziertes Thioredoxin wieder reaktiviert.

Da reduziertes Thioredoxin und PAPS die Substrate der nachfolgenden Reaktion sind, stellte sich die Frage, ob die PAPS-Reduktase auch durch Oxidation von SH-Gruppen am Enzym deaktiviert werden kann. Dazu wurde die PAPS-Reduktase zunächst mit Oxidationsmitteln und Inhibitoren vorinkubiert, bevor die Aktivität des Enzyms mit Thioredoxin und DTT bestimmt wurde (Tabelle 14).

nach Vorinkubation	PAPS-Reduktaseaktivität	
	nmol/mgxmin	% Restaktivität
Kontrolle	0.8	=100
GSSG	0.4	50
DCPIP	0.4	50
FAD	0.6	75
Ferricyanid	0.7	88
Lipoamid	0.9	113
Dehydroascorbat	0.8	100
TNBS	0.1	13
Bromsuccinimid	0.0	0

Tabelle 14:

Einfluß von Oxidationsmitteln und Inhibitoren auf die Aktivität der PAPS-Reduktase

Die Vorbehandlung der bakteriellen PAPS-Reduktase mit Oxidationsmitteln wie GSSG und DCPIP führte trotz eines 6fachen Überschuß an DTT im nachfolgenden Reaktionsansatz zu einer 50 %igen Hemmung der Aktivität. Weniger wirksam erwiesen sich FAD und Ferricyanid als Inhibitoren. Eine Vorinkubation mit TNBS ergab eine 87 %ige Inhibierung. Als vollständig irreversibel unter den gegebenen Versuchsbedingungen zeigte sich die Hemmung des Enzyms durch Bromsuccinimid.

Wie auf Seite 25 für die APS-Kinase aus E.coli eine Hemmung durch BSI und Oxidationsmittel gezeigt wurde, konnte auch die PAPS-Reduktase durch diese Verbindungen inhibiert werden.

2.3.2.2 Untersuchung der PAPS-Reduktase auf "Sulfo-Thioredoxin" als mögliches Zwischenprodukt in E.coli

In der Literatur liegen Hinweise vor, daß das in der PAPS-Reduktase gebildete Sulfit gebunden an Thioredoxin in Form von Sulfo-Thioredoxin aus der Reaktion hervorgeht (Tsang & Schiff 1976) und bis zum Einbau in die Aminosäure Cystein das Schwefelmolekül trägt. Diese Form des Thioredoxins ist bislang noch nicht isoliert worden. Die weiteren Untersuchungen des PAPS-Reduktase Systems aus E.coli hatte zum Ziel, Aufschluß über eine mögliche Bildung von Sulfo-Thioredoxin zu geben.

Dazu wurde zunächst ein Reaktionsansatz, der die gereinigte PAPS-Reduktase und Thioredoxin-Reduktase sowie homogenes Thioredoxin enthielt, mit NADPH und ^{35}S -PAPS inkubiert. Nach Chromatographie des Reaktionsgemisches an Sephadex G50 konnte im Eluat der Säule Radioaktivität nachgewiesen werden, die an die Proteinfraktion gebunden worden war ($140.000\text{cpm/mgProtein} = 1.75\text{ nmol S/mg}$). Dieser Anteil an proteingebundener Radioaktivität entsprach 2.4 % des gesamten, austauschbaren Schwefels, der im gleichen Zeitraum gebildet worden war.

Die Proteinfraktion wurde mithilfe der isoelektrischen Fokussierung auf

Ultradünnschicht-Polyacrylamidfolien (UDIEF) im pH-Intervall von pH 3-10 aufgetrennt. Die Abbildung 29 zeigt die Verteilung der Proteinbanden nach Anfärbung mit Serva Violett (a). Das entsprechende Autoradiogramm (b) zeigt die Verteilung der Radioaktivität in diesem IEF-Gel.

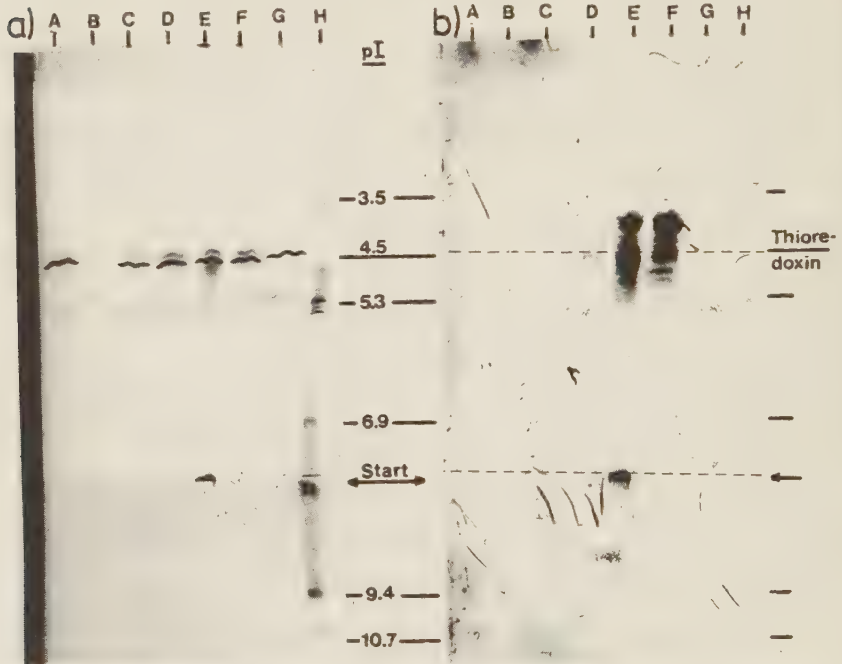


Abbildung 29: Auftrennung der Proteine des PAPS-Reduktase-Systems aus E.coli durch IEF im pH-Gradienten von 3 - 10 (a) und anschließender Autoradiographie (b)

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 50 μ l: Tris-HCl 100 mmol/l (pH 7.6), 35 S-PAPS 0.5 mmol/l (spez. Aktivität 79.000 cpm/nmol), NADPH 10 mmol/l, Thioredoxin 35 μ g, Thioredoxin-Reduktase 2 μ g und PAPS-Reduktase 3.2 μ g (Lauf "F"). In den Kontrollansätzen fehlte: NADPH (Lauf "A"), Thioredoxin (Lauf "B"), PAPS-Reduktase (Lauf "C") und 35 S-PAPS (Lauf "G"), oder enthielten zusätzlich: BSA 50 μ g (Lauf "E") und unmarkiertes Na_2SO_3 0.2 μ mol (Lauf "D"). Inkubationszeit: 2 Stunden

Im pH-Intervall von pH 5.0 - pH 3.8 konnte eine Vielzahl von ^{35}S -markierten Proteinen durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Dabei waren in diesem pH-Bereich mindestens 10 markierte Substanzen nachweisbar, die aber nur in 5 Banden mit den angefärbten Proteinen übereinstimmen. Für die Bildung von ^{35}S -Sulfo Thioredoxin (pI 4.5) wurden keine Hinweise erhalten, obwohl das reine Thioredoxin in Substratmengen eingesetzt worden war (Abbildung 29 a).

Da in einem Kontrollansatz, dem BSA zugegeben war, zusätzlich noch ein ^{35}S -markierter BSA-Bereich hinzukam (pI 5.3 - 4.7, pI BSA: 5.0), können Einwände gegen die Spezifität dieser Bildung ^{35}S -markierter Proteine nicht übersehen werden.

Die Bildung der ^{35}S -markierten Peptide war abhängig von der Anwesenheit des Reduktanden NADPH (A), des Thioredoxins (B) und der PAPS-Reduktase (C). Um den möglichen Einwand zu entkräften, daß es sich bei der proteingebundenen Radioaktivität um Sulfatesterbindungen handelt, wurde zunächst der PAPS-Reduktase Ansatz in Gegenwart von nicht-radioaktiven Sulfit inkubiert (D). Dieses hatte zur Folge, daß kein Einbau des ^{35}S -Isotops in die Proteinfraction stattfand.

Gleichzeitig konnte nach der Elektrophorese und Autoradiographie die an die Proteine gebundene Radioaktivität durch Inkubation des Gels mit unmarkiertem Na_2SO_3 entfernt werden. Als endgültiger Beweis für proteingebundenes Sulfit kann die Freisetzung von säurelabilem Schwefel aus den Proteinbanden des Gels betrachtet werden. Dazu wurde das Gel nach Autoradiographie quer zur Laufrichtung in 1cm große Abschnitte geteilt, und nach Austausch mit unmarkiertem Sulfit wurde durch Ansäuerung der säurelabile Schwefel aus den Gelabschnitten bestimmt. Dieses ergab ein Maximum an säurelabilem Schwefel in dem Bereich des Gels, der bereits zuvor durch Autoradiographie identifiziert worden war (Abbildung 30).

Dieses Verfahren ermöglichte einen extrem empfindlichen Nachweis für

proteingebundene Radioaktivität. Wie aus der Abbildung 29 hervorgeht, wurden in der Autoradiographie der IEF zusätzliche Bereiche gefunden, in denen Proteine mit Serva Violett nicht mehr nachweisbar waren. Dabei konnte jedoch das Sulfo-Thioredoxin als Zwischenprodukt der PAPS-Reduktase Reaktion *in vitro* nicht bestätigt werden. Die vorhandene, protein-gebundene Radioaktivität scheint eher aus einer unspezifischen Nebenreaktion des gebildeten Sulfits hervorzugehen, da selbst zusätzliches Fremdprotein (BSA) in diesem Ansatz ^{35}S -markiert werden konnte (siehe Abbildung 29, Lauf E).

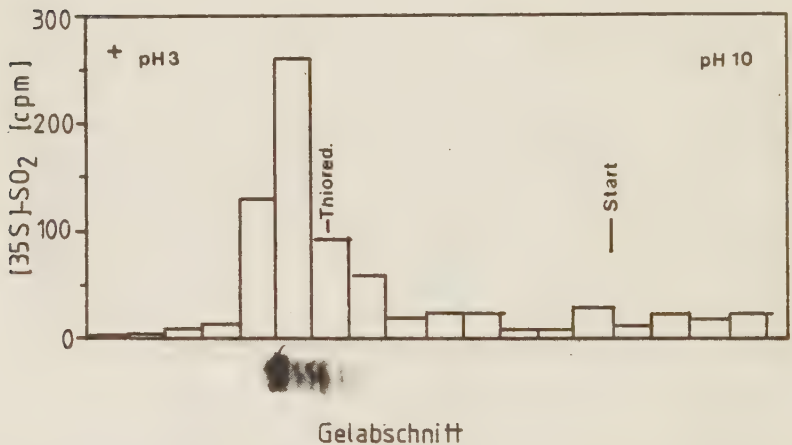


Abbildung 30: Freisetzung von $^{35}\text{SO}_2$ aus dem UDIEF-Gel (Abbildung 29 "F") nach Inkubation mit Na_2SO_3 (10 μmol) und Ansäuerung mit $6\text{N H}_2\text{SO}_4$

2.3.2 Reduktion von APS und PAPS in Chlamydomonas reinhardtii

Charakterisierung einer APS/PAPS-reduzierenden Aktivität

Die Methode zur Separierung des Proteinrohextrakts in Sulfat-aktivierende und -reduzierende Enzymaktivitäten, wie sie für E.coli und Hefe entwickelt worden war (Abbildung 23), konnte nicht unmittelbar auf die Proteinfraction aus der Alge übertragen werden. Dagegen wurde eine Enzymfraction, die in Gegenwart von DTT Sulfid aus APS oder PAPS freisetzte, bei der Präparation der APS-Kinase aus C.reinhardtii (siehe Methoden 5.1c) erhalten. Diese Proteinfraction wurde nach Schmidt (1972) als "APS-Sulfotransferase" (=AST) bezeichnet. APS war das bevorzugte Substrat, wenn DTT als Reduktionsmittel im Test vorlag (Tabelle 15).

aktiviertes Sulfat	Bildung von austauschbarem Sulfid cpm (%)		
	Rohextrakt	Blue-Sep.: NaCl-Eluat	Durchlauf
APS	157483 (100)	60170 (100)	89430 (100)
PAPS	26700 (17)	13226 (22)	17942 (18)

Tabelle 15: Sulfonukleotidspezifität der Sulfid-Bildung in C.reinhardtii

Die Ansätze enthielten : Tris-HCl 50 mmol/l (pH 7.6), NaF 0.5 mmol/l, ^{35}S -APS bzw. ^{35}S -PAPS 10 $\mu\text{mol/l}$ (spez. Aktivität 64.200 cpm/nmol), DTT 8 mmol/l und Enzymprotein 11 μg in einem Gesamtvolumen von 0.25 ml; Inkubationsdauer: 20 Minuten, 30°C

Der Unterschied zu den PAPS-Reduktase-Systemen aus E.coli und Hefe bestand darin, daß diese Sulfid-freisetzende Sulfotransferase Aktivität gemeinsam mit der APS-Kinase an die Affinitätsmatrix adsorbiert wurde. Bei Hefe und E.coli wurde die entsprechende PAPS-Reduktase Aktivität im Ausschlußvolumen des Affinitätsgels erhalten, wobei nur die APS-Kinase retardiert wurde. Darüberhinaus war dieses Enzym nicht spezifisch für PAPS wie die bakterielle PAPS-Reduktase, sondern setzte vorzugsweise APS zu Sulfid um.

2.3.2.1 Einfluß von Thioredoxin auf die APS-Sulfotransferase Aktivität

Da Thioredoxin als Elektronenüberträger für die Sulfitbildung aus PAPS in E.coli und Hefe essentiell war, sollte auch der Einfluß von Thioredoxin auf die Freisetzung von Sulfit aus APS in C.reinhardtii untersucht werden. Dazu wurde die Enzymfraktion nach Schritt III (siehe Methoden 5.1c) mit APS und dem Thioredoxin aus E.coli inkubiert. Das Thioredoxin des Bakteriums wurde deshalb verwendet, weil es große Gemeinsamkeiten mit dem pflanzlichen m-Typ aufwies, und die Möglichkeit vorhanden war, es enzymatisch mit NADPH zu reduzieren (NADPH/Thioredoxin-Reduktase). Wurde DTT als Reduktionsmittel eingesetzt (Tabelle 16), so zeigte sich, daß die AST auch in Abwesenheit des Proteinfaktors aus APS Sulfit freisetzte. Durch den Zusatz von Thioredoxin konnte in Gegenwart des artifizierten Reduktionsmittels nur eine geringfügige Erhöhung der Sulfitfreisetzung (20 %) erhalten werden. Da in einem Kontrollansatz aber auch durch Zugabe der Thioredoxin-Reduktase eine 30 %ige Steigerung der Aktivität stattfand, kann dieser Anstieg möglicherweise als ein unspezifischer Proteineffekt gewertet werden. Parallel zur Messung der AST mit DTT als Reduktionsmittel wurde auch NADPH als Reduktand eingesetzt. Thioredoxin, das dabei enzymatisch mit der NADP:Thioredoxin-Oxidoreduktase reduziert worden war, erwies sich im Vergleich mit DTT als weniger geeignetes Reduktionsmittel für die Bildung von Sulfit aus APS.

Faktoren im Ansatz	³⁵ S-SO ₂ gebildet (cpm / 15 min)	
	mit DTT	mit NADPH
AST + Thio + Thio-Reduktase	83.115 (136 %)	3.460 (6 %)
AST + Thio-Reduktase	79.170 (130 %)	2.700 (4 %)
AST + Thio	73.358 (120 %)	1.500 (2 %)
AST	61.452 (100 %)	1.700 (3 %)
minus AST	456 (1 %)	96 (0 %)

Tabelle 16: Einfluß von Thioredoxin (E.coli) auf die AST Aktivität

Reaktionsansätze wie in 15; Thioredoxin 6 µg, Thioredoxin-Reduktase 50 µg

Bei einer gegenüber DTT 30 bis 40 fach niedrigeren Rate im NADPH-System wurde jedoch die Freisetzung von Sulfit aus APS durch Thioredoxin und der Thioredoxin-Reduktase um 100 % erhöht.

Die Versuche konnten als Hinweis gesehen werden, daß Thioredoxin aus *E. coli* als Elektronendonator für die Bildung von Sulfit aus APS bei *Chlamydomonas* weniger geeignet war. Da Thioredoxin aber als Aktivator von Enzymen der Sulfatassimilation in Erscheinung tritt, sollte auch die Möglichkeit einer Enzymaktivierung durch Thioredoxin untersucht werden.

Dazu wurde die AST zunächst mit Oxidationsmitteln vorinkubiert und anschließend wurde die Aktivität in An- und Abwesenheit des homologen Thioredoxins aus *Chlamydomonas* (I+II) bestimmt. Zusätzlich sollte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren mögliche Unterschiede zu der PAPS-Reduktase aus *E. coli* erhalten werden (Tabelle 17).

Eine Vorinkubation der AST in DCPIP und Ferricyanid führten zur kompletten Desaktivierung. Die Anwesenheit von FAD im Vorinkubationsge-

Vorinkubation (10')	SO ₂ gebildet (nmol/mgxmin)	
	in 2mM:	
	DTT ohne Thioredoxin	DTT mit Thioredoxin (I+II)
Kontrolle	24.8	25.6
GSSG	38.5	23.1
DCPIP	0.0	0.0
Ferricyanid	0.0	0.0
FAD	3.3	1.8
Lipoamid	13.3	7.7
Dehydroascorbat	28.2	25.6
TNBS	0.0	0.0
Bromsuccinimid	0.0	0.0

Tabelle 17 Einfluß von Oxidationsmittel und Inhibitoren nach Vorinkubation mit der APS-Sulfotransferase aus *Chlamydomonas*

Reaktionsansätze wie in Tabelle 15; Vorinkubation: siehe Methoden 5.2d

misch ergab eine über 80 %ige Hemmung. Lipoamid inhibierte nach Vorinkubation mit dem Protein die Sulfit-Bildung zu ca. 50 %, während Dehydroascorbat keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität ausübte. Im Gegensatz zu dem Enzym aus *E.coli* führte eine Vorinkubation mit GSSG zu einer Stimulierung der Rate.

In keinem der Fälle konnte ein signifikanter Einfluß des homologen Thioredoxins auf die Reaktivierung der enzymatischen Aktivität beobachtet werden. Eher wurde durch die Anwesenheit des Thioredoxins eine geringfügige Hemmung der Aktivität in allen Ansätzen erhalten.

Sowohl der Lysin- als auch der Cystein-spezifische Inhibitor (TNBS und Bromsuccinimid) desaktivierten das Enzym zu 100 %.

Vergleicht man diese Untersuchungen mit denen, die unter identischen Bedingungen bei der PAPS-Reduktase aus *E.coli* erhalten wurden (Abbildung 31), so zeigte sich, daß die Sulfitbildung in *Chlamydomonas* weit-
aus empfindlicher gegenüber Oxidationsmitteln war.

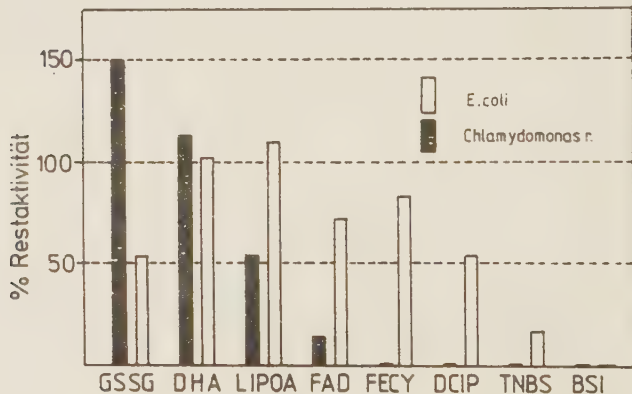


Abbildung 31: Einfluß von Oxidationsmitteln und Inhibitoren auf die PAPS Reduktase (*E.coli*) und APS-Sulfotransferase (*C.reinhardtii*)

Die enzymatische Aktivität der Alge wurde vollständig und irreversibel durch DCPIP und FeCy sowie durch beide Inhibitoren (TNBS und BSI) gehemmt. In E.coli wirkten sich ausschließlich DCPIP und GSSG inhibitorisch aus (50 % Restaktivität), wohingegen GSSG *) bei der Alge eine 50 %ige Stimulierung der APS-reduzierenden Aktivität ergab.

Durch den SH-Inhibitor Bromsuccinimid konnte die Aktivität aus beiden Organismen komplett inaktiviert werden. Der Lysin-spezifische Inhibitor wirkte sich zu über 80 % hemmend auf die PAPS-Reduktase aus, während die AST vollständig inhibiert wurde.

Die Beteiligung eines homologen oder eines heterologen Thioredoxins bei der Bildung von Sulfit aus APS in Chlamydomonas konnte aus diesen Versuchen nicht ausreichend geklärt werden. Da jedoch die verwendete AST-Fraktion bereits Thioredoxine oder Thioredoxin-ähnliche Proteine in ausreichender Menge enthalten konnte, wurde sie nach weiteren Reinigungsschritten auf den Gehalt an Thioredoxin untersucht. Zum weiteren Verständnis der AST Aktivität erschien darüber hinaus die Untersuchung auf katalytische Eigenschaften und Teilaktivitäten notwendig, insbesondere auf Thioredoxin, APS-Kinase-, Diaphorase- und Glutathion-Reduktase Aktivität

2.3.2.2 Enzymatische Teilaktivitäten der AST

a) Thioredoxin-Eigenschaft

Da die APS-Sulfotransferase nicht durch Zugabe von Thioredoxin stimuliert werden konnte, wurde zunächst die Anwesenheit von Thioredoxinen in dieser Proteinfraktion vermutet. Aus diesem Grund wurde die AST-Fraktion an einem Molekularsieb (Sephacryl S300) chromatographiert, da Thioredoxine wegen des geringen Molekulargewichts (um 12 k) durch diesen Schritt aus der AST (um 250 k) separiert werden. Der Nachweis von

*) Die Oxidationsmittel wurden aufgrund des 6fachen DIT-Überschuß im Ansatz z.T. chemisch reduziert.

Thioredoxin im Säuleneluat erfolgt dabei mithilfe der PAPS-Reduktase aus *E.coli*, da dieses Verfahren ausreichend empfindlich ist. *)

Die Abbildung 32 gibt das Elutionsdiagramm der AST an einem kalibrierten Gel (Sephacryl S300) wieder (vergl. Abbildung 10). Dabei konnten 2 Bereiche im Säuleneluat mit Thioredoxin-Eigenschaft gefunden werden, wovon die höhere Thioredoxin-Aktivität gleichzeitig mit der AST (app. MG 250k) eluiert wurde. Der kleinere Anteil an Thioredoxin-Aktivität wurde im Bereich um 30 k eluiert. In dem Fraktionierungsbereich der Säule von 12.5 k (Cyt. c), der dem Thioredoxin aus *Chlamydomonas* entspricht, konnte dagegen keine Thioredoxin-Aktivität gefunden werden.

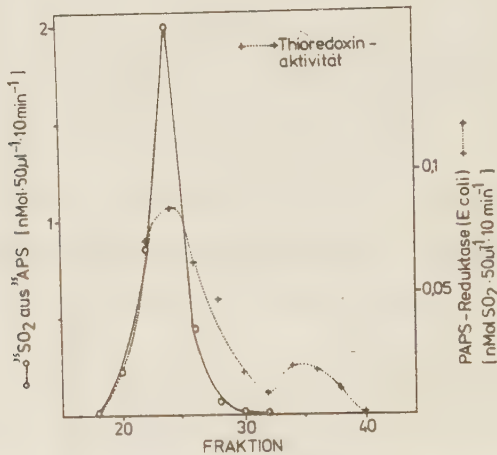


Abbildung 32: Gelfiltration der APS-Sulfotransferase an Sephacryl S300
APS-Sulfotransferase Aktivität ○—○ ; Thioredoxin Aktivität +----+

*) Um eine mögliche Störung in diesem Testsystem durch die APS/PAPS-reduzierende Aktivität der Alge zu vermeiden, wurde das Eluat der Säule zunächst in Ferricyanid (2 mmol/l) 20 Minuten lang vorinkubiert. Dabei wird die AST aus *Chlamydomonas* irreversibel inaktiviert, wohingegen die PAPS-Reduktase aus *E.coli* annähernd unbeeinflusst bleibt (vergl. Abbildung 31).

b)APS-Kinase Aktivität:

Die pflanzliche AST hat eine hohe Spezifität und Affinität für APS (s.w.u), die K_m liegt im Bereich von 10^{-6} mol/l, (Schmidt 1976). Für die APS-Kinase aus *C.reinhardtii* wurde ebenfalls eine sehr hohe Affinität zum Substrat berichtet ($K_m < 2 \mu\text{mol/l}$; Jender & Schwenn 1984). Die Autoren zeigten, daß in der Reaktionskinetik der noch nicht homogenen APS-Kinase aus *C.reinhardtii* Sulfitschwefel als Zwischenprodukt auftrat (Schwenn & Jender 1981), so daß APS-Kinase und AST- Aktivität bei partiell gereinigten Enzymfraktionen als Gemisch vorzuliegen schienen. Daher wurde die angereicherte AST (Schritt III, Eluat Blue Sepharose) auf APS-Kinase Aktivität untersucht (Methoden 5.2a). Dazu wurden in einer Reaktionskinetik die gebildeten Mengen an PAPS und austauschbarem Sulfid aufgenommen (Abbildung 33).

Es zeigte sich, daß die angereicherte AST in Gegenwart von ATP äquimolare Mengen an austauschbarem Sulfid und PAPS bildete. Beide Produkte wurden mit annähernd gleicher Rate ($4.2 \text{ nmol/mg} \cdot \text{min}$) über einen Zeitraum von 5 Minuten gebildet.

Die chromatographischen Methoden zur Anreicherung der AST führten also zu einer gleichzeitigen Anreicherung der APS-Kinase.

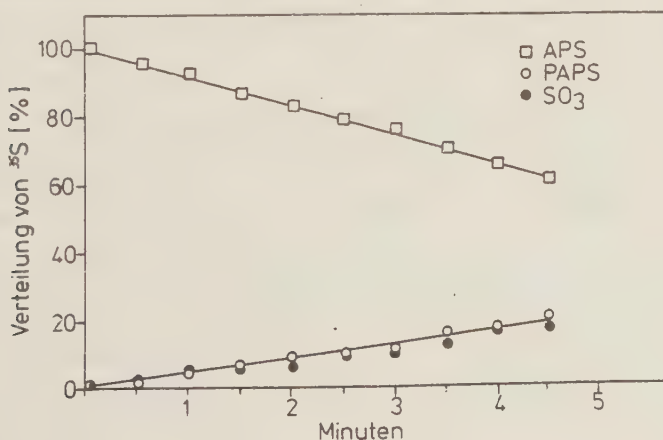


Abbildung 33: Kinetik der Bildung von PAPS und Sulfid in der APS-Sulfotransferase Reaktion nach Chromatographie an Blue Sepharose. Ansätze wie in Tabelle 5; APS: $10 \mu\text{mol/l}$, ATP $100 \mu\text{mol/l}$

Weitere Versuche, diese beiden Aktivitäten zu separieren, blieben zunächst ohne Erfolg. Weder durch Chromatofokussierung an PBE 94 noch durch hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B konnte eine Trennung in APS-Kinase und AST erhalten werden. Ebenso war es durch kovalente Chromatographie an Thiol-Sepharose nicht möglich, die APS-Kinase aus der Fraktion zu separieren, da auch die AST an die aktivierte Thiolmatrix gebunden wurde. Diese gemeinsame Eigenschaft, die den Besitz von exponierten SH-Gruppen voraussetzt, ließ eine kovalente S-S-Bindung zwischen beiden Aktivitäten vermuten. Zur Spaltung der Disulfidbrücke(n) dieses "Proteinkomplexes" wurde die Fraktion nach Affinitätschromatographie an Blue-Sepharose mit DTT inkubiert und anschließend an einem Molekularsieb (Sephacryl S300) chromatographiert.

Dabei konnte gezeigt werden, daß in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit und der DTT-Konzentration eine APS-Kinase Aktivität aus der AST-Fraktion entfernt wurde, die in einem niedermolekularen Fraktionierungsbereich der Säule eluierte (Abbildung 34a-c).

Das Elutionsdiagramm der Proteinfraction ohne diese DTT-Behandlung (34a), ergab einen synchronen Verlauf beider Aktivitäten, wobei ihr gemeinsames Aktivitätsmaximum im Molekulargewichtsbereich von 250 k gefunden wurde. Eine Vorinkubation (1 h, 4°C) in 1 mM DTT hatte zur Folge, daß eine zweite APS-Kinase Aktivität im Fraktionierungsbereich des Molekularsiebes eluierte, dem ein apparentes Molekulargewicht von 25 k entspricht (34b). Durch Erhöhung der DTT-Konzentration auf 10 mmol/l und einer dreistündigen Vorinkubation wurde annähernd die gesamte APS-Kinase Aktivität in den niedermolekularen Bereich überführt (34c). Dieses Verhalten der beiden Aktivitäten unterstützt die Annahme einer kovalenten S-S Disulfidbrücke zwischen APS-Kinase und AST in *C. reinhardtii*.

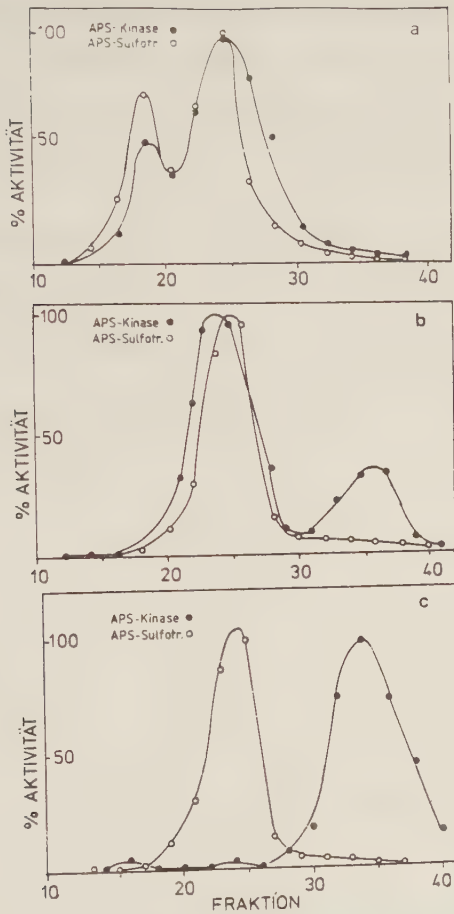


Abbildung 34: Elutionsdiagramm der Proteinfraction nach Blue-Sepharose an Sephacryl S300 nach Vorinkubation in: 0 mM DTT (a); 1 mM DTT, 1 h (b) und 10 mM DTT 3 h (c)
Elution: 50 mM Imidazol-HCl (pH 7.4), Flußrate 0.4 ml/min, Säule 2 x 53 cm, Fraktionen a 3.8 ml

In Ergänzung zur säulenchromatographischen Trennung beider Aktivitäten in Gegenwart hoher Konzentrationen an DTT konnte mithilfe der Chromatofokussierung gezeigt werden, daß nach der Behandlung der Proteinfraction mit dem Reduktionsmittel die APS-Kinase bei einem pH von 6.2 eluierte, während die im "Komplex" enthaltenen Aktivitäten mit einem apparenten pI von 5.9 eluierten (Abbildung 35).

Durch isoelektrische Fokussierung in einem Agarose-Gel - ein im Vergleich zur Säulenchromatographie hochauflösendes Trennsystem - konnte eine Diaphorase als weitere Nebenaktivität der AST nachgewiesen werden.

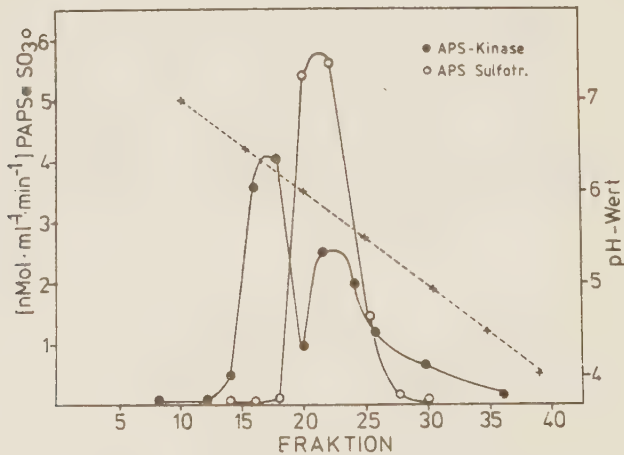


Abbildung 35: Auftrennung von APS-Kinase (●) und APS Sulfotransferase (○) nach Inkubation mit DTT (1 mmol/l, 1h) durch Chromatofokussierung an PBE 94 im absteigenden pH-Gradienten von pH 7 - 4

c) Diaphorase-Aktivität

Die AST wurde nach vorausgegangener Behandlung mit DTT und Gelfiltration an Sephacryl S300 durch Ultrafiltration konzentriert (2 mg/ml). Von dieser Probe wurden 0.4 ml (in Imidazol-HCl 25 mmol/l) für die Diaphorase-IEF im pH-Gradienten von 3 - 10 eingesetzt (Abbildung 36).

Nach elektrophoretischer Trennung im pH-Gradienten wurden parallel zur AST (Maximum der Aktivität in Fraktion 18) die Diaphorase-Aktivität mit NADPH als Donor und DCPIP als Akzeptor bestimmt. Dabei fokussierten AST und Diaphorase im pH-Bereich von 5.5, wobei die enzymatischen Aktivitäten nahezu synchron verliefen. Ein zweites Aktivitätsmaximum der Diaphorase fokussierte im pH-Bereich von 6.8.

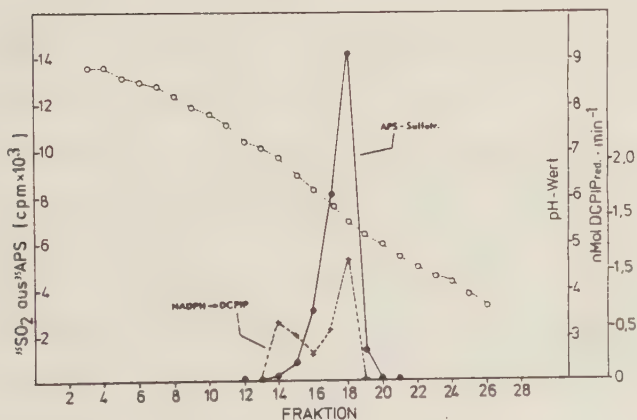


Abbildung 36: Isoelektrische Fokussierung der APS-Sulfotransferase in Agarose im pH-Intervall von pH 3 - 10

○ pH-Gradient, ● APS-Sulfotransferase, + Diaphorase Aktivität

Wurde die Fraktion, die das Maximum an APS-Sulfotransferase Aktivität aufwies, in der zweiten Dimension der SDS-Gelelektrophorese unterzogen, konnten nach Anfärbung der Proteine mit einem Silber-Reagenz insgesamt noch 5 Peptide lokalisiert werden. Die Bestimmung der Molekulargewichte ergab für diese Fraktion 76, 66, 56, 36 und 16 k (Abbildung 37). Die Identifizierung der einzelnen Proteine aufgrund ihrer Funktion ist nach diesem Trennschritt jedoch nicht mehr möglich, da das SDS die Struktur des Enzyms zerstört.

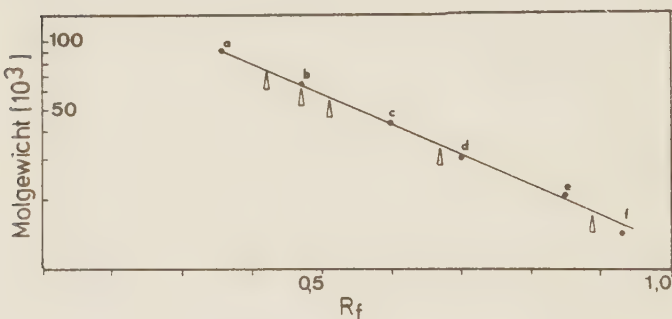


Abbildung 37: SDS-Gelelektrophorese der AST in der 2. Dimension nach IEF

MG-Standards : a: 92.5 k, b: 66.2 k, c: 45 k, d: 31 k, e: 21.5 k und f: 14.4 k

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß es sich bei der AST nicht um ein einzelnes Enzym handelt, sondern um einen Komplex, der aus vielen Einzelaktivitäten zusammengesetzt ist. Darunter konnte eine kovalent gebundene APS-Kinase nachgewiesen werden, sowie ferner eine Diaphorase Aktivität und eine Thioredoxin-Eigenschaft.

Analog zu den Untersuchungen bei E.coli sollte abschließend auch in der Sulfid-bildenden Reaktion von Chlamydomonas das entstehende Produkt näher charakterisiert werden.

2.3.2.4 Bildung und Nachweis eines ^{35}S -markierten Peptids

Obwohl die APS-Sulfotransferase bis zum heutigen Zeitpunkt noch niemals homogen isoliert worden ist, werden für den Mechanismus weitgehende Hypothesen diskutiert (Übersicht: Schiff & Fankhauser 1981). Demnach überträgt die AST das aktivierte Sulfat aus APS auf einen niedermolekularen Carrier, der in *Chlorella* als GSH (Tsang & Schiff 1978) bzw. als ein niedermolekulares Protein (Abrahams & Schiff 1973) identifiziert wurde.

Auch in Chloroplasten aus Spinat wurde als Zwischenprodukt der Sulfat-reduktion ein niedermolekulares Protein nachgewiesen, das den Schwefel in Form eines Thiosulfats ($\text{X-S-SO}_3\text{H}$) trägt (Schwenn 1970, Schmidt & Schwenn 1971).

Da bei *E.coli* das gebildete Sulfit aus der PAPS-Reduktion in einer Nebenreaktion relativ unspezifisch mit Proteinen reagieren kann (vergl. Abbildung 29), sollte überprüft werden, ob in *Chlamydomonas* das austauschbare Sulfit ($\text{RS-SO}_3\text{H}$) nicht ebenfalls aus einer unspezifischen Addition des freien Sulfits mit den vorhandenen Proteinen entstehen kann.

Dazu wurde ein Gesamt Zellextrakt (Methoden 5.1c) isoliert, der mit den Substraten ^{35}S -APS und ^{35}S -PAPS sowie mit den Reduktionsmitteln DTT, NADPH oder NADPH/GSH für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde mithilfe der isoelektrischen Fokussierung auf Ultradünnschicht-Polyacrylamidfolien die Verteilung der ^{35}S -markierten Proteine durch Autoradiographie analysiert (Abbildung 38).

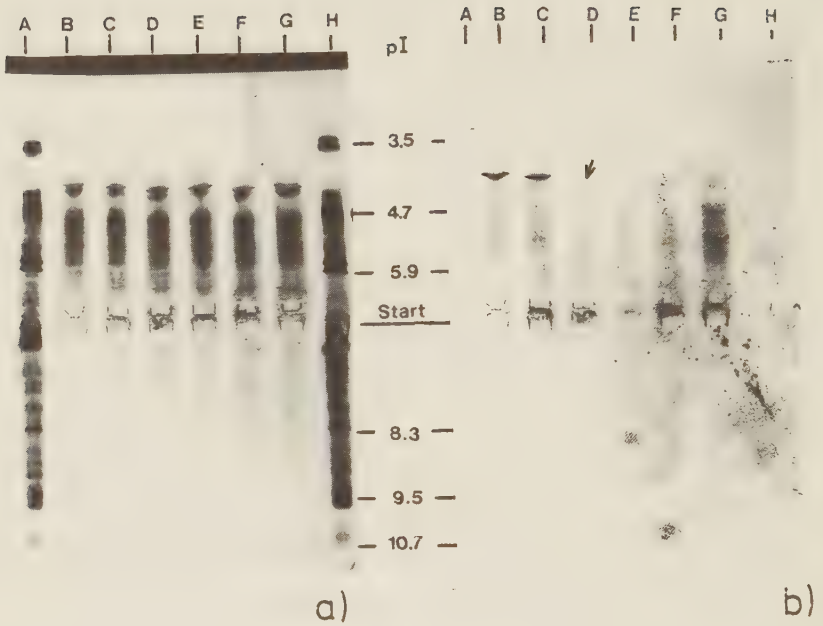


Abbildung 38: Auftrennung der Proteinfraction aus *C.reinhardii* nach

APS-Sulfotransferase-assay durch UDIEF im pH-Gradienten von 3 - 10;

(a) Proteinnachweis (Serva Violett), (b) Autoradiogramm des Gels,

Substrat APS: C, E, G; Substrat PAPS: B, D, F;

Reduktanden: DTT: B + C; NADPH: D + E; NADPH/GSH: F + G

pI-Standard A + H

Reaktionsbedingungen: Tris-HCl 50 mmol/l (pH 8.0), ³⁵S-(P)APS 0,5 mmol/l (spez. Aktivität 80.200 cpm/nmol), NADPH oder DTT 5 mmol/l, GSH 50 µmol/l, Protein 150 µg in einem Volumen von 0.05 ml, Inkubation: 1h 30 °C.

In diesem Versuch konnte die selektive Bildung eines ^{35}S -markierten Polypeptids nachgewiesen werden, das gebildet wurde, wenn die Reaktionssteilnehmer APS oder PAPS zusammen mit DTT und dem Proteinextrakt der Alge inkubiert worden waren (B + C). Nur die Kombination PAPS/NADPH führte ebenfalls zu einem geringen Anstieg der Markierung in dieser Fraktion (D, Pfeil). Das physiologische Reduktionsmittel GSH ergab nach Inkubation mit den radioaktiven Sulfonukleotiden keinen Einbau des Schwefels in dieses Peptid. Hier konnte nur eine unspezifische Verteilung der Radioaktivität über den gesamten Bereich erhalten werden, der besonders hoch nach Inkubation mit APS und GSH/NADPH (G) als Reduktionsmittel war.

Das spezifisch markierte Protein fokussierte im pH-Gradienten von 3 - 10 im Bereich von pH 4. Wie die Verteilung der Proteine nach UDIEF zeigt, gehört dieses Peptid zu den stark sauren, konstitutiven Proteinen der Alge. Aus Gründen der Einfachheit soll im nachfolgenden Text daher für dieses Peptid die Bezeichnung "pI 4-Peptid" eingeführt werden.

Wurde der Reaktionsansatz "C" (Abbildung 38), der DTT und ^{35}S -APS enthielt, nach Inkubation mithilfe der SDS-Gelelektrophorese (12 % Polyacrylamid) aufgetrennt, konnte man säurelabilen Schwefel nur aus dem Gelabschnitt der Laufront freisetzen (Abbildung 39).

In wie weit diesem Peptid eine Rolle bei der Bildung von austauschbarem Sulfit zugeordnet werden kann, sollte eine kinetische Studie ergeben. Dazu wurde aus einem APS-Sulfotransferase Ansatz, der DTT, ^{35}S -APS und die dialysierte Proteinfraktion enthielt, zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, in denen der gesamte, austauschbare Schwefel bestimmt wurde. Parallel dazu wurden Aliquots zur gleichen Zeit entnommen und mit der UDIEF analysiert. Das pI 4-Peptid wurde zunächst durch Färbung und Autoradiographie im Gel lokalisiert. Nach Elution mit F_2O_2 (1 Tag)

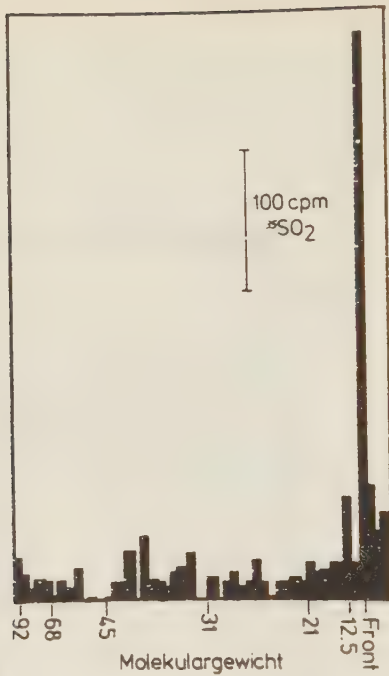


Abbildung 39: Freisetzung von ^{35}S aus der Proteinfraktion der AST-Reaktion nach SDS-Gelelektrophorese
Der Ansatz "C" aus Abbildung 38 wurde für diesen Versuch eingesetzt

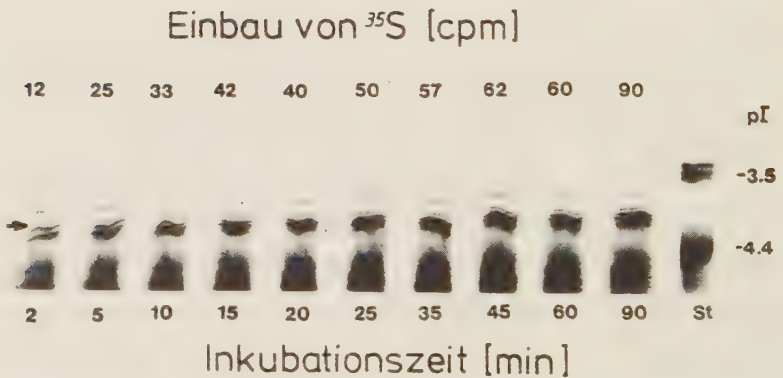


Abbildung 40: Kinetik des Einbaus von ^{35}S in das pI 4-Peptid im APS-Sulfotransferase Ansatz nach UDIEF
Reaktionsbedingungen: siehe Abbildung 38 Ansatz "C"

wurde die Radioaktivität in diesen Banden bestimmt.

Dabei zeigte sich, daß in Abhängigkeit von der Zeit eine kontinuierliche Markierung des Peptids mit ^{35}S -Sulfit stattfand (Abbildung 40), während die Anfärbbarkeit dieser Bande unverändert blieb. Aus diesem Grund kann angenommen werden, daß dieses Protein nicht während der Anlagerung des Sulfits aus einer größeren Einheit freigesetzt wird, sondern von Anfang an frei vorliegen muß. Ebenso wurde durch die Markierung mit Sulfit die Lage des markierten Peptids im pH-Bereich von pH 3 - 10 nicht wesentlich verändert. *)

Die Abbildung 41 vergleicht die Rate der Gesamt-Sulfitbildung (A) mit der Rate des ^{35}S -Einbaus in das pI 4-Peptid (B). Daraus geht hervor, daß innerhalb der ersten 10 Minuten nach Inkubationsbeginn sowohl die Bildung von Sulfit als auch die des markierten pI 4-Peptids erhöht war.

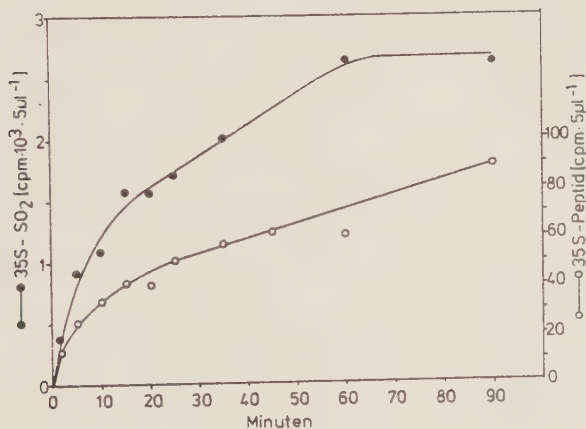


Abbildung 41: Kinetik der Bildung von $^{35}\text{SO}_3^{2-}$ und des ^{35}S -pI 4-Peptids in der APS-Sulfotransferase Reaktion von C.reinhardtii

Reaktionsansatz: siehe Abbildung 38 C, zugehöriges UDIEF-Gel in Abbildung 40 (Pfeil)

*) Da der spezifische Nachweis für Häm-haltige Proteine negativ ausfiel, wird ein freier Sulfit-Sirohämkomplex für das pI4-Peptid ausgeschlossen.

Während d.e Bildung von austauschbarem Sulfit nach 60 Minuten zum Stillstand kam, verlief der Einbau des Schwefels in das Peptid mit unveränderter Rate weiter. Da zeitlich betrachtet die Bildung des pI 4-Peptids nicht der Bildung von austauschbarem Sulfit vorausging, kann die Markierung dieses Peptids nicht als Ursache für die Entstehung von Sulfit in Chlamydomonas gewertet werden.

2.3.3 Zusammenfassender Vergleich: Adenylylsulfat-Reduktion

Die PAPS-Reduktasen aus Hefe und E.coli wiesen eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten auf, die sich deutlich von der Sulfatreduktion in der Alge unterschieden. Dabei ist die große Spezifität der PAPS-Reduktasen für Phospho-adenylylphosphosulfat (PAPS) einer der Unterschiede. Demgegenüber setzt die gereinigte Proteinfraktion aus Chlamydomonas sowohl APS als auch PAPS um. Unter den experimentellen Bedingungen war APS das bevorzugte Substrat.

Als essentiellen Elektronendonator benötigen die PAPS-Reduktasen Thioredoxin, das entweder enzymatisch (NADP-Thioredoxin-Oxidoreduktase EC 1.6.4.5) oder chemisch (DTT, GSH) reduziert vorliegen muß. Dabei ist die Spezifität hinsichtlich der Herkunft des Thioredoxin bei der PAPS-Reduktion in E.coli gering. Auffallend war vor allem die katalytische Aktivität der PAPS-Reduktase, wenn Thioredoxin m aus Spinatchloroplasten als Cofaktor im Reaktionsansatz vorlag. Das plastidäre Thioredoxin konnte das homologe Thioredoxin zu 100 % ersetzen. Demgegenüber besaß das entsprechende Enzym aus Hefe eine weitaus höhere Spezifität für Thioredoxin. Hier erzielten die heterologen Thioredoxine aus Spinat oder E.coli nur 20 % der Aktivität, die das Enzym mit dem homologen Thioredoxin II aufwies. Der Vergleich der beiden Thioredoxine aus Hefe ergab, daß sich Thioredoxin II über 30 mal aktiver als Thioredoxin I in der PAPS-Reduktase Reaktion aus E.coli erwies.. Bei Chlamydomonas war in der Reduktion von APS oder PAPS zu Sulfit eine Beteiligung von exogenem Thioredoxin als Elektronendonator oder als Aktivator nicht nachweisbar. Die APS-Sulfotransferase-Aktivität besaß selber eine Thioredoxin-Eigenschaft, sowie als weitere Nebenaktivitäten der AST noch eine Diaphorase Aktivität und eine über Disulfidbrücken gebundene APS-Kinase Aktivität nachgewiesen wurden.

Die Gemeinsamkeiten der Sulfit-bildenden Systeme aus *E.coli* und *C.reinhardtii* bestand darin, daß beide Aktivitäten durch Bromsuccinimid inaktivierbar waren und an aktivierter SH-Sepharose kovalent gebunden wurden. Ferner wurden beide durch Vorbehandlung mit Oxidationsmitteln deaktiviert. Dabei konnte nach einer Vorbehandlung mit FeCy oder DCPIP die Aktivität der AST im Gegensatz zur PAPS-Reduktase aus *E.coli* nicht wiederhergestellt werden.

S-Sulfothioredoxin als Reaktionsprodukt konnte weder in *E.coli* noch in *C.reinhardtii* nachgewiesen werden. Dagegen wurde in Zellgesamtextrakten der Alge die selektive Markierung eines kleinen (> 10 k), stark sauren (pI 4), ^{35}S -markierten Proteins beobachtet. Die Markierung dieser S:Sulfoverbindung wurde mit ^{35}S -APS oder ^{35}S -PAPS als Sulfonylgruppendonor beobachtet, wenn DTT als Reduktionsmittel eingesetzt worden war. Bei der Verwendung von NADPH konnte dieses Peptid nur schwach markiert werden, wenn PAPS als Sulfonyldonor verwendet wurde. Ein Einbau wurde nicht erhalten, wenn zu dem Ansatz mit NADPH noch GSH in geringer Konzentration ($50 \mu\text{mol/l}$) zugesetzt worden war. In diesem Fall wurde eine stärkere, unspezifische Markierung der gesamten Proteinfraktion erhalten, wenn APS als zweites Substrat vorlag.

3. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, zu klären, wo und in wie weit sich die Enzymologie des mikrobiellen "PAPS-Reduktase-Weges" vom pflanzlichen "APS-Sulfotransferase-Weg" unterscheidet. Dabei sollte in dieser Reaktionssequenz gezielt die Bedeutung des Thioredoxins in seiner Funktion als Enzymaktivator sowie als elektronenliefernder Cofaktor geklärt werden.

Die Untersuchungen wurden vergleichend an der C-autotrophen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, an dem C-heterotrophen Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* und an dem C-heterotrophen Prokaryonten *Escherichia coli* durchgeführt. Dazu wurden aus diesen Organismen die entsprechenden Thioredoxine, sowie die APS-Kinase und das Sulfit-bildende System isoliert bzw. hochangereichert. Zusätzlich wurden größere Mengen Thioredoxin f und m aus Spinatchloroplasten isoliert.

Die APS-Kinase konnte aus allen drei Organismen durch Affinitätschromatographie und durch Chromatofokussierung in kürzester Zeit hoch angereichert werden. Der Reinigungsschritt an Blue Sepharose CL-6B erlaubte dabei eine 100 - 400fache Anreicherung des Enzyms aus dem Rohextrakt. In der nachfolgenden Gelfiltration an Sephacryl S300 konnten die apparenten Molekulargewichte der Enzyme bestimmt werden, und gleichzeitig wurde die Probe dabei für die Chromatofokussierung konditioniert. Die Affinität der APS-Kinase zu dem Farbstoff Cibachron Blue F3GA (Scopes 1982) wird auch zur Isolierung der APS-Kinase aus *Penicillium* ausgenutzt (Renosto et al 1984).

Der Vergleich der molekularen Eigenschaften der Kinasen untereinander ergab kein homogenes Bild, sondern wies deutliche Unterschiede im Molekulargewicht und im isoelektrischen Punkt auf. Das apparente Molekulargewicht des Enzyms aus Hefe konnte durch SDS-PAGE im Bereich von 28 k

ermittelt werden und stimmt annähernd mit dem von Renosto et al (1984) bei *Penicillium* ermittelten Molekulargewicht überein. Das bakterielle Enzym konnte unter denaturierenden Bedingungen im Bereich von 40 k ermittelt werden und liegt somit in der Größenordnung der APS-Kinase aus *C.reinhardtii*, die im SDS-System bei 45 k lokalisiert wurde (Jender & Schwenn 1984). Die isoelektrischen Punkte der Enzyme unterschieden sich zwischen Hefe (pI 7.4) und *E.coli* (pI 5.5) um annähernd 2 pH-Einheiten. Der IEP des Enzyms der Alge konnte bei pH 6.2 bestätigt werden (Jender & Schwenn 1984).

Die eigenen Untersuchungen zur Enzymaktivierung durch Thioredoxin ergaben für die Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion in *Chlamydomonas*, daß ausschließlich die APS-Kinase eine Aktivierung durch Thioredoxin erfuhr. Die Aktivierung des Enzyms durch Thioredoxin war abhängig von der Dauer der Vorinkubation des Enzyms mit Thioredoxin und DTT sowie von der Konzentration und dem Typ des Thioredoxins (f oder m). Bei der Aktivierung der APS-Kinase aus der Alge erwies sich Thioredoxin f aus Spinatchloroplasten spezifischer als Thioredoxin m. Diese höhere Spezifität für Thioredoxin f hat die APS-Kinase der Alge gemeinsam mit den Schrittmacherenzymen des Calvinyklus, da auch dort Thioredoxin f eine größere Spezifität besitzt als der m-Typ (Wolosiuk et al 1979). Diese Untersuchungen ergänzen die von Jender und Schwenn (1984) beschriebene Stimulierung der APS-Kinase aus *C.reinhardtii* durch Sulfhydrylgruppen, wobei reduziertes Thioredoxin f als physiologisches Reduktionsmittel diese Funktion in vivo übernehmen könnte.

Erstmals konnte am Beispiel der APS-Kinase gezeigt werden, daß auch in C-heterotrophen Bakterien und Hefen eine Enzymaktivierung durch Thioredoxin existieren kann. Eine Vorinkubation der bakteriellen APS-Kinase mit homologem Thioredoxin (DTT reduziert) führte zu einer Zunahme der katalytischen Aktivität um über 200 %. Wurde das Enzym zuvor mit dem

Oxidationsmittel GSSG behandelt, war die enzymatische Aktivität vollständig inhibiert. In diesem Fall konnte die Aktivität nur durch reduziertes Thioredoxin rekonstituiert werden. Auch für das Enzym der Hefe konnte eine Aktivierung durch homologes Thioredoxin beobachtet werden, was sich im optisch gekoppelten Test in einem exponentiellen Verlauf der Aktivierung ausdrückte. Die Anwesenheit von Thiolen bei der Aktivierung durch Thioredoxin war erst für das gealterte Enzym notwendig, in frischen Präparationen konnte keine Thiol-Abhängigkeit bei der Aktivierung der Kinase beobachtet werden.

Die Erscheinung, daß eine Thioredoxin-abhängige Enzymaktivierung in C-heterotrophen Organismen ausgeprägt ist, kann in Zusammenhang mit der nachfolgenden PAPS-Reduktase Reaktion erklärt werden. In dieser Reaktion wird mit Thioredoxin als Elektronendonator PAPS zu Sulfit und PAP reduziert. Die Aktivierung der APS-Kinase durch reduziertes Thioredoxin kann somit als ein positiver Substrateffekt betrachtet werden, wobei das Enzym aktiviert wird, welches die Bildung des zweiten Substrats (PAPS) für die nachfolgende Reaktion (PAPS-Reduktase) katalysiert. PAPS kann demnach erst dann entstehen, wenn reduziertes Thioredoxin vorhanden ist.

Eine Regulation in diesem zweiten Schritt der Schwefelassimilation erscheint äußerst ökonomisch für die Zelle, da erst durch die Katalyse der APS-Kinase APS aus dem unvorteilhaften Reaktionsgleichgewicht der ATP-Sulfurylase ($G' = +11 \text{ kcal/mol}$) entfernt wird, wenn das Reduktionsmittel für den nächsten Schritt vorliegt. Die Regulation setzt damit in der Gesamtsequenz relativ früh an einer physiologisch irreversiblen Reaktion (APS-Kinase) an.

Ein analoges Regulationsprinzip, in dem Thioredoxin diejenige Reaktion aktiviert, aus der das Substrat für eine Thioredoxin-abhängige Reduktion hervorgeht, diskutieren Maness & Orenco (1975) bei der Biosynthese

der Desoxyribonukleotide in Rattenleber. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Nukleosidmonophosphatkinase in Gegenwart von Thiolverbindungen, speziell durch Thioredoxin, aktiviert werden konnte. Die auffallende Analogie der beiden Thioredoxin-abhängigen Stoffwechselwege veranschaulicht die Abbildung 42.

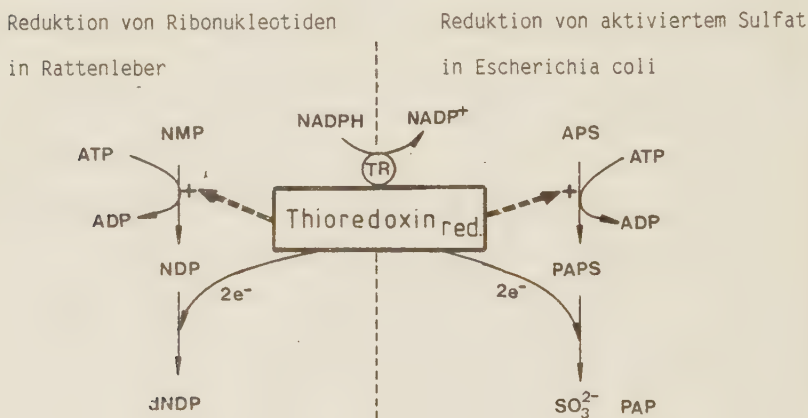


Abbildung 42: Thioredoxin als Aktivator und Cofaktor in der Reduktion von Ribonukleotiden in Rattenleber und von Sulfat in E. coli & Hefe

Während die APS-Kinase durch Reduktionsmittel aktiviert werden konnte, wirkten sich Oxidationsmittel eher hemmend auf die katalytische Aktivität aus. Wie hier gezeigt werden konnte, wurden die Enzyme aus E.coli und aus C.reinhardtii durch das physiologische Oxidationsmittel GSSG vollständig inhibiert. Das Enzym der Hefe wurde unter gleichen Bedingungen nur partiell inhibiert (34 %). Nach Vorinkubation mit dem Oxidationsmittel DCPIP lagen alle 3 Enzyme in einer inaktiven Form vor, die reversibel wieder durch reduziertes Thioredoxin in die aktive Form überführt werden konnten. Der hemmende Einfluß von Oxidationsmitteln

auf die katalytische Aktivität der APS-Kinase steht in Übereinstimmung mit dem Verhalten anderer Thioredoxin-aktivierbarer Enzyme nach Inkubation mit Oxidationsmitteln. So konnte gezeigt werden, daß GSSG und Dehydroascorbat die Thioredoxin-abhängige Fructose-1,6-bisphosphatase (Schürmann & Wolosiuk 1978), die Phosphoribulokinase (Wolosiuk & Buchanan 1978) und die Phenylalanin Ammonium Lyase (Wolosiuk et al 1978) desaktivierten.

Die Aktivierung der APS-Kinase durch Thioredoxin setzt voraus, daß zugängliche und reaktive SH-Gruppen am Protein lokalisiert sind. Diese konnte durch kovalente Chromatographie an aktivierter Thioi-Sepharose für das Enzym der Alge gezeigt werden (vergl. Tabelle 3). Durch diesen Schritt werden alle Proteine, die zugängliche SH-Gruppen tragen, kovalent an das Gel gebunden (vergl. Abbildung 43).

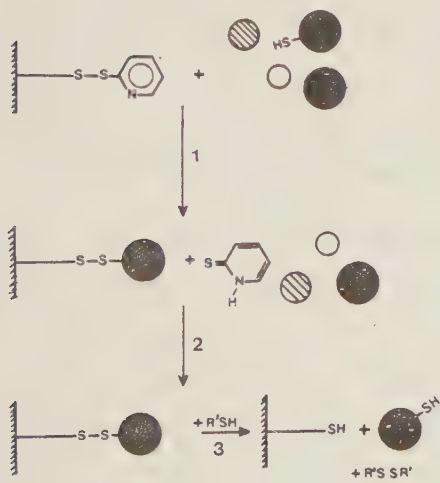


Abbildung 43: Prinzip der kovalenten Chromatographie :

- 1: Bindung SH-haltiger Verbindungen (z.B. Proteine)
- 2: Auswaschen des nicht-gebundenen Materials
- 3: Elution der gebundenen Verbindungen durch Thiole

Protein mit exponierter SH-Gruppe

Die APS-Kinase aus Hefe konnte hingegen nicht kovalent an die Thiolma-

Die durchgeführten Untersuchungen zur Reduktion des aktivierten Sulfats ergaben, daß Thioredoxin ein essentieller Cofaktor der PAPS-Reduktase Reaktion in *E.coli* und Hefe war. Eine Bildung von Sulfit fand nicht statt, wenn die verschiedenen Reduktionsmittel in Abwesenheit des Thioredoxins mit dem Substrat inkubiert wurden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Daten von Tsang (1981a), aus denen hervorgeht, daß das bakterielle Enzym reduziertes Thioredoxin als Elektronendonator benötigte. Für die PAPS-Reduktase aus *E.coli* konnte in Gegenwart des Reduktionsmittels DTT (6.4 mmol/l) eine apparente K_m von 1.3 $\mu\text{mol/l}$ für das homologe Thioredoxin ermittelt werden. Dieser Wert liegt um eine Zehnerpotenz niedriger als der von Tsang (1981) ebenfalls bei *E.coli* erhaltene Wert von 15 $\mu\text{mol/l}$ (DTT 3mmol/l). Da die Konzentration an Thioredoxin in einer *E.coli* Zelle im Bereich von 15 $\mu\text{mol/l}$ liegt (Holmgren et al. 1978), scheint der hier ermittelte kleinere K_m -Wert des Enzyms für Thioredoxin eher physiologisch relevant zu sein.

In der Lineweaver-Burk Darstellung ($1/v$ gegen $1/\text{PAPS}$) konnte für die PAPS-Reduktase keine typische Michaelis-Kinetik erhalten werden, da bei niedrigen Konzentrationen an Thioredoxin die Geschwindigkeit für steigende PAPS-Konzentrationen nicht erhöht werden konnte (Abbildung 26). Dieses Verhalten weist auf die Aktivierung des Enzyms durch Thioredoxin hin (Segel 1975).

Ergänzend wurde gezeigt, daß Oxidationsmittel die Aktivität des Enzyms nach vorausgegangener Vorinkubation inhibierten (Tabelle 13). Der direkte Beweis für eine Aktivierung der PAPS-Reduktase durch Thioredoxin ist deshalb schwierig, da Thioredoxin für die Katalyse essentiell ist. Der inhibierende Effekt von GSSG auf die Aktivität der PAPS-Reduktase wurde bereits von Tsang (1981a) erwähnt. Den gleichen Effekt konnte Holmgren (1979a) auch bei der Ribonukleotid-Reduktase aus *E.coli* durch Behandlung des Enzyms mit GSSG zeigen.

Demnach besitzt das Thioredoxin in der assimilatorischen Sulfatreduktion von *E.coli* 3 Funktionen:

- 1.) Aktivator der APS-Kinase
- 2.) Aktivator der PAPS-Reduktase
- 3.) Elektronendonator in der PAPS-Reduktase (Abbildung 44)

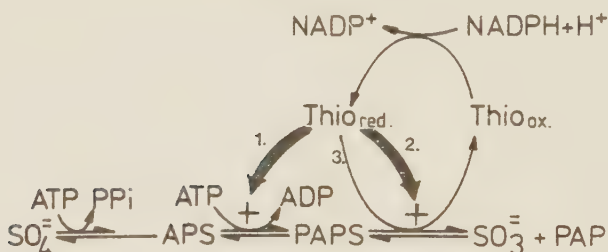


Abbildung 44: Thioredoxin als Aktivator (1 und 2) und Cofaktor in der assimilatorischen Sulfatreduktion von *E.coli*

Weitere Untersuchungen zeigten, daß nicht nur das homologe Thioredoxin in der PAPS-Reduktase aus *E.coli* als Elektronendonator diente, sondern auch Thioredoxine aus *S.cerevisiae*, *C.reinhardtii* und Spinat (Abbildung 5 & 27). Thioredoxin m aus Spinatchloroplasten erwies sich dabei als besonders geeignet, da es das homologe Thioredoxin zu 100 % ersetzen konnte. Gleichzeitig war das Thioredoxin aus *E.coli* ein geeigneter Aktivator der NADP-MDH (Abbildung 4). Diese Gemeinsamkeit ist wahrscheinlich auf die große Sequenzhomologie (ca. 60 %) der beiden Thioredoxine zurückzuführen (Tsugita et al 1983). Von den beiden Thioredoxinen aus Hefe (I und II) konnte bei der Reduktion von PAPS fast ausschließlich Thioredoxin II als Cofaktor dienen. Es erwies sich 30mal aktiver als Thioredoxin I. Diesem Thioredoxin wird nach Porque et al. 1970b) eine spezifische Funktion in der Ribonukleotid Reduktase zugewiesen.

Die Untersuchungen zur Bildung von Sulfo-Thioredoxin in der PAPS-Reduktase gaben keine Hinweise auf seine Beteiligung als stabiles Zwi-

schenprodukt der Sulfatreduktion in vitro.

In Gegenwart des physiologischen Reduktionsmittels NADPH konnte im PAPS-Reduktase System zwar proteingebundener Schwefel in Form von Protein-S:SO₃H aus PAPS gebildet werden, dieser Einbau erfolgte aber nicht spezifisch in das Thioredoxin. Da in Kontroll-Experimenten zugegebenes Rindersealbumin entstehendes Sulfit anlagern konnte, läßt sich vermuten, daß die Reaktion von freiem Sulfit mit Proteinen als spontane, nicht-enzymatische "Sulfitolyse" erfolgte:



Aus den hier vorliegenden Untersuchungen kann Sulfo-Thioredoxin nicht als ein stabiles Zwischenprodukt der PAPS-Reduktase Reaktion bestätigt werden. Für einen Mechanismus mit freien Zwischenstufen des Sulfits und Sulfids spricht erstens die Existenz einer NADP abhängigen Sulfitreduktase, sowie ferner die Tatsache, daß freies Sulfit und Sulfid in E.coli nachweisbar sind (Übersicht: Siegel 1975). Der von Tsang & Schiff (1976) vorgeschlagene Weg der assimilatorischen Sulfatreduktion über proteingebundene Zwischenprodukte kann für E.coli nicht aufrecht gehalten werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Reduktion von aktiviertem Sulfat in Chlamydomonas zeigten, daß eine PAPS-Reduktase in der Alge, wie sie in E.coli und Hefe nachweisbar war, in vitro nicht gemessen werden konnte. Ähnlich wie bei Chlorella wurde in C.reinhardtii eine APS-Sulfotransferase Aktivität (AST: Schmidt 1972) gefunden, die Thiol-abhängig aus PAPS und vorzugsweise aus APS austauschbares Sulfit freisetzte.

Der erste Unterschied zum bakteriellen System bestand in einer geringeren Spezifität der APS-Sulfotransferase zu ihrem Substrat. Sowohl APS als auch PAPS konnte als Sulfatdonor in die Reaktion eingehen, wobei APS unter den experimentellen Bedingungen das bevorzugte Substrat war. Im Gegensatz dazu besaß das Enzym aus E.coli und Hefe eine hohe Spezi-

fität zu PAPS und konnten APS nicht reduzieren.

Die APS-Sulfotransferase Aktivität wurde im Verlauf der Reinigung permanent von einer APS-Kinase Aktivität begleitet, die, wie hier gezeigt werden konnte, kovalent über Disulfidbrückenbildung an die APS-Sulfotransferase gebunden war (Abbildung 34a-c). Erst nach Behandlung mit DTT konnten die beiden Aktivitäten durch Gelfiltration oder Chromatofokussierung separiert werden.

Die freie APS-Kinase besaß ein apparentes Molekulargewicht um 30 k und einen pI von 6.2. Ihre Ablösung aus der APS-Sulfotransferase führte in dieser Fraktion zu einem relativen Massenverlust von ca 30 k, so daß pro APS-Sulfotransferase ein gebundenes APS-Kinase Molekül vermutet werden kann. Ebenso zeigte sich bei der Ablösung der APS-Kinase aus dem AST-Komplex durch DTT eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes. Der pI der freien Kinase lag bei pH 6.2. Gebunden an die AST konnte ein IEP für beide Aktivitäten um 5.9 bestimmt werden, während die AST, die keine meßbare APS-Kinase Aktivität mehr enthielt, einen pI von 5.5 besaß. Die Anwesenheit einer APS-Kinase in der APS-Sulfotransferase von *C. reinhardtii* wurde auch von Jender (1982) beobachtet, und auch Varma und Nicholas (1971) berichteten in *Nitrobakter* von einem Enzymkomplex aus APS-Kinase und PAPS-Reduktase. Die Enzyme der Sulfataktivierung und der Reduktion sind demnach strukturell eng miteinander assoziiert. Ein weiterer Unterschied der APS-Sulfotransferase zu der PAPS-Reduktase bestand darin, daß das pflanzliche System unabhängig von Thioredoxin war, wohingegen Thioredoxin in *E.coli* und Hefe für die Reduktion der essentielle Cofaktor ist. Eine nähere Untersuchung der APS-Sulfotransferase ergab, daß diese Aktivität selber eine Thioredoxin-Eigenschaft besaß. Die APS-Sulfotransferase scheint demnach im Besitz eines gebundenen, "eigenen" Thioredoxins zu sein, so daß die Reaktion bislang als Thioredoxin-unabhängig erschien.

Frühere, eigene Untersuchungen (Schwenn und Schriek 1984) ergaben, daß nach zahlreichen chromatographischen Reinigungsschritten eine Sulfonukleotid-unspezifische Sulfotransferase aus *C.reinhardtii* erhalten werden konnte, die durch Zugabe von Thioredoxin aktiviert wurde. Hier erwies sich Thioredoxin m geeigneter als Thioredoxin f, wenn als Substrat APS eingesetzt wurde. Da hier das Thioredoxin aber nur als Aktivator und nicht als essentieller Cofaktor bestätigt werden konnte, muß dieser aktivierende Effekt auf eine Rekonstitution der APS-Sulfotransferase Aktivität, mit Thioredoxin m zurückgeführt werden. Eine Erklärung hierfür wäre eine Abreicherung des "eigenen" Thioredoxins während der Reinigung der APS-Sulfotransferase.

Das Vorkommen von Thioredoxin-ähnlichen Aktivitäten wie in der APS-Sulfotransferase ist in pflanzlichen Organismen nicht außergewöhnlich. Es sind bislang mehrere Thioredoxin-Aktivitäten als Bestandteile von hochmolekularen Proteinkomplexen beschrieben worden (McKinney et al 1979; Jaquot et al 1983). Dazu gehört die δ -Untereinheit des Kopplungsfaktors CF1 und die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (EC 4.1.1.39), sowie die Thioredoxine des c-Typs (Crawford et al 1979), die zu den Proteinen mit Thioredoxin-ähnlichen Eigenschaften gezählt werden (Buchanan, persönl. Mitteilung).

Nach isoelektrischer Fokussierung in Agarose wurden durch SDS-Gelelektrophorese noch insgesamt 5 Polypeptide für die AST nachgewiesen. Die Molekulargewichte betrugen 76, 66, 58, 36 und 16 k und ergaben in der Summe 252 k. Ein gleich hoher Wert konnte auch durch Gelfiltration für die native AST erhalten werden.

In dieser hochangereicherten Fraktion konnte eine Diaphorase-Aktivität lokalisiert werden, die mit NADPH den Elektronenakzeptor DCPIP reduzieren konnte. In Übereinstimmung dazu konnten in den von Urlaub und Jankowski (1982) isolierten "APS-reduzierenden Partikeln" aus Catharan-

thus roseus ebenfalls elektronenübertragende Aktivitäten nachgewiesen werden (z.B. Glutathion-Reduktase).

In Analogie zu den Untersuchungen auf Sulfo-Thioredoxin als Zwischenprodukt der PAPS-Reduktase bei E.coli wurde bei der Grünalge ein teilgereinigter Proteinextrakt mit den ^{35}S -markierten Substraten APS oder PAPS sowie den Reduktionsmitteln DTT, GSH/NADPH und NADPH inkubiert. Dabei erfolgte ein Einbau des radioaktiven Schwefels in die Proteinfraction der Alge. Das hochauflösende Trennverfahren der isoelektrischen Fokussierung auf Ultradünnschicht Polyacrylamid Folien ermöglichte es, durch Autoradiographie die exakte Verteilung der Markierung in dieser Fraction zu bestimmen.

Es zeigte sich dabei, daß in Gegenwart des Reduktionsmittels DTT in der AST-Reaktion die selektive Bildung eines ^{35}S -markierten Peptids stattfand, wobei keine Spezifität für APS oder PAPS ausgeprägt war. Wurde das artifizielle Dithiol DTT durch den physiologischen Reduktanden NADPH ersetzt, konnte nur noch mit PAPS als Sulfonylgruppendonator eine geringe Markierung des Peptids erhalten werden. Lag das physiologische Monothiol GSH in katalytischen Mengen ($50\text{ }\mu\text{mol/l}$ im GR/NADPH reg. System) vor, fand kein Einbau in das Peptid statt. Nur der unspezifische Einbau der Markierung in die gesamte Proteinfraction war höher; besonders dann, wenn APS als Substrat eingesetzt worden war.

Die selektive Markierung in diesem Peptid war gegenüber schwachen Säuren stabil (15 % TCA oder 10 % Essigsäure). Radioaktives Sulfit konnte nach vorausgegangener Inkubation mit unmarkiertem Trägersulfit daraus freigesetzt werden. Das Peptid besaß einen isoelektrischen Punkt von ca. 4.0 und wurde daher als pI 4-Peptid bezeichnet. Das apparente Molekulargewicht des pI 4-Peptids lag unterhalb von 10 k. Aus kinetischen

Studien ging hervor, daß der Anstieg der ^{35}S -Markierung in dieser Verbindung nicht mit einer Freisetzung dieses Peptids einherging, sondern daß das pI 4-Peptid zu den konstitutiven Proteinen der Algen gehörte. Diese Ergebnisse decken sich mit zahlreichen, früheren Beobachtungen, in denen sowohl für pflanzliche Organismen als auch für Hefe und Bakterien die Sulfatassimilation mit der Bildung von gebundenem Sulfit in Form von $\text{R-S:SO}_3\text{H}$ einhergehen soll (vergl. Kapitel 1).

Die Verbindungen, die bislang als Sulfit-Carrier-Proteine beschrieben wurden, zeigen bezüglich der Größe und Ladung große Übereinstimmungen mit dem hier dargestellten pI 4-Peptid. Demgegenüber besteht jedoch ein wesentlicher Unterschied zu den beschriebenen Molekülen in der Bildung der ^{35}S -Markierung. Die in vitro Synthesen von "Carrier gebundenem Sulfit" wurden bislang immer in strenger Abwesenheit von Sulfhydrylverbindungen ausgeführt (Abrahams & Schiff 1973), um eine Thiolyse zu verhindern, bei der aus S-Sulfoverbindungen durch einen Überschuß an Thiole Sulfit freigesetzt werden kann (Gleichung 1).



In den vorliegenden Versuchen hingegen konnte die Ausbildung des ^{35}S -Peptids nur deutlich dargestellt werden, wenn das artifizielle Reduktionsmittel DTT im Testansatz vorlag. Da DTT speziell zur Reduktion pflanzlicher Thioredoxine eingesetzt wird, darf im Zusammenhang mit der selektiven Markierung des ^{35}S -Peptids die Rolle des Thioredoxins nicht außer acht gelassen werden, zumal in Grünalgen auch eine Reduktion des Thioredoxins mit NADPH (Tsang 1981b) erfolgen kann.

Aus dem direkten Vergleich der Sulfit-bildenden Systeme von *E.coli* und *C.reinhardtii* wird ersichtlich, daß der Unterschied eigentlich eher ein struktureller und weniger ein funktioneller ist (Abbildung 45). Während in *E.coli* die Komponenten APS-Kinase, PAPS-Reduktase, Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase als vier separate Proteine gewonnen werden

können, sind diese Aktivitäten in der Alge zu einem Komplex als APS-Sulfotransferase vereinigt.

1. Die kovalent gebundene APS-Kinase ist für die Substratspezifität hinsichtlich des Sulfonylgruppendonors verantwortlich. Ihre hohe Affinität zu APS erlaubt es wahrscheinlich, APS ohne weitere Phosphorylierung zu PAPS umzusetzen, wobei das artifizielle Dithiol DTT möglicherweise "entkoppelt".
2. Eine enzymgebundene Thioredoxin-Eigenschaft macht die Sulfitbildung der Alge unabhängig von zusätzlichem Thioredoxin. Erst nach Verlust des "endogenen" Faktors kann ein positiver Einfluß von Thioredoxin festgestellt werden (Schwenn & Schriek 1984).
3. Die Diaphorase Aktivität deutet auf einen Reduktionsschritt hin, der aufgrund der Thioredoxin-Eigenschaft des Komplexes in der Lage ist, oxidiertes Glutathion zu reduzieren. Glutathion-Reduktase und eine unspezifische Dithiol-Reduktase wurden auch in APS reduzierenden Partikeln aus Zellsuspensionskulturen von *Catharanthus* nachgewiesen (Urlaub & Jankowski 1982).
4. Das natürliche Reduktionsmittel ist noch nicht bekannt. NADPH konnte in Suspensionskulturen von *Catharanthus* als Elektronendonator bei der Reduktion von Sulfat zu Sulfit nachgewiesen werden (Schwenn et al 1979), und steht in guter Korrelation zu den Ergebnissen von Cao et al (1984), in denen gezeigt wurde, daß in C-heterotrophen Zellkulturen von *Daucus* ein Thioredoxin-System analog zu Bakterien und Pilzen mit NADPH als Reduktand ausgebildet wurde. Die Reduktionsmittel DTT oder GSH, die bislang zur Messung der AST eingesetzt wurden, scheinen nur eine Teilsequenz des Komplexes zu erfassen.
5. Das Produkt der Reaktion kann nicht generell als ein gebundenes Sulfit beschrieben werden, da sowohl freies als auch proteingebundenes Sulfit bei der Reduktion von aktiviertem Sulfat entstehen kann. Diese

Ergebnisse sprechen gegen die bislang vertretene Vorstellung, daß in pflanzlichen Systemen freies Sulfit und Sulfid nicht gebildet wird, sondern nur in "gebundener Form" auftritt. Die hier erhaltenen Ergebnisse, die für eine Sulfatreduktion über die freien Zwischenprodukte sprechen, werden unterstützt durch die Existenz eines intrazellulären Schwefelzyklus in Pflanzen (Übersicht Rennenberg 1984), der über freies Sulfit verläuft, sowie die Tatsache, daß Thioredoxin und GSH in der Lage sind, Verbindungen vom Typ XSSO_3H zu reduzieren (Mannervik et al 1983).

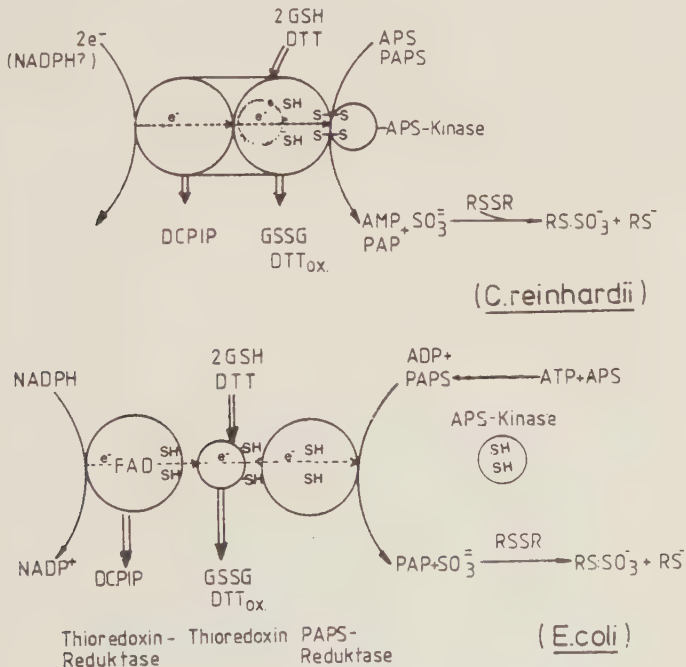


Abbildung 45: Vergleich der Sulfat-aktivierenden und -reduzierenden Systeme aus *C. reinhardtii* und *E. coli*. Während die Enzyme in *E. coli* in freier Form vorliegen: Thioredoxin-Reduktase ($\text{NADPH} \rightarrow \text{DCPIP}$), Thioredoxin ($\text{NADPH} \rightarrow \text{GSSG}$), Thioredoxin + PAPS-Reduktase ($\text{DTT/GSH} \rightarrow \text{PAPS}$), sind diese Aktivitäten in *C. reinhardtii* in einem Komplex zusammengefaßt, an dem die APS-Kinase kovalent gebunden ist.

Die zweite Funktion des Thioredoxins bei der assimilatorischen Sulfat-reduktion wurde in der Rolle als H-Donor der PAPS-Reduktase gefunden. Bei *E.coli* ist die Affinität dieses Enzyms für reduziertes Thioredoxin und für PAPS als Substrate sehr hoch (K_m app. für homologes Thio(SH)₂ 1.3 μ mol/l, K_m app. für PAPS 8 μ mol/l). Bei Verwendung von DTT als Reduktionsmittel ließ sich das bakterielle Thioredoxin durch Thioredoxin aus Spinatchloroplasten vollständig ersetzen. Diese Substitution war nicht möglich, wenn das Thioredoxin enzymatisch mithilfe der bakteriellen NADP: Thioredoxin Oxidoreduktase reduziert wurde.

Reaktionsprodukt der PAPS-Reduktase war unter physiologischen Bedingungen (Reduktion des Thioredoxins durch NADPH) freies Sulfit. S: Sulfo-Thioredoxin konnte nicht als Zwischenprodukt der Reaktion nachgewiesen werden; proteingebundene Formen des Sulfits wurden als Artefakte des Testsystems identifiziert.

Der enzymatische Mechanismus zur Reduktion aktivierten Sulfates in *C. reinhardtii* unterschied sich vom bakteriellen in zwei wesentlichen Punkten: (1) die Bildung von Sulfit war nicht abhängig von Thioredoxin und (2), der Umsatz mit APS als Substrat war bis zu 10-fach höher als mit PAPS, wobei ausschließlich DTT oder GSH als Reduktand verwendet werden konnte. Die Anreicherung des Enzyms führte zur Isolierung eines Proteinkomplexes (app. MW 250 k, Gelfiltration), der eine APS-Kinase, eine "Diaphorase" und eine endogene Thioredoxin-Aktivität enthielt. Für die APS-Kinase konnte gezeigt werden, daß S-S Brücken zur Bindung an den Komplex notwendig sind. Die Annahme einer Beteiligung der Diaphorase-Aktivität an der Reduktion von APS wurde durch Inaktivierung des Komplexes mithilfe von Oxidationsmitteln unterstützt.

Analog zur PAPS-Reduktase bei *E.coli* war das Reaktionsprodukt der APS-Sulfotransferase Aktivität freies Sulfit; aus den unspezifisch markierten Proteinen konnte ein kleines, stark saures Peptid (MW 10 k, pI 4)

durch IEF separiert werden, das nicht identisch ist mit S: Sulfo-Thioredoxin. Aus der Reaktionskinetik konnte kein Hinweis für die Beteiligung des Peptids an der Sulfit-Bildung erhalten werden.

Die Unterschiede im enzymatischen Mechanismus bei *C. reinhardtii* wurden als Folge der Zusammenlagerung einzelner Enzymaktivitäten zu einem APS-Sulfotransferase Komplex diskutiert.

5. MATERIAL & METHODEN

5.1 Extraktion und Reinigung der APS-Kinase

Die generelle Aufarbeitungsmethode für das Enzym aus allen drei Organismen bestand in einer Affinitätschromatographie (Blue-Sepharose CL-6B Pharmacia, Freiburg), einer Gelfiltration (Sephacryl S300, Pharmacia Freiburg) und einer Chromatofokussierung (PBE 94, Pharmacia Freiburg).

a) *Escherichia coli*:

200 Gramm Zellen wurden in Homogenisierungspuffer Tris- SO_4 50 mmol/l (pH 7.8), MgSO_4 10 mmol/l, PMSF 1 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, und MSH 10 mmol/l in einer Ribi-Presse (20.000 psi) aufgeschlossen. Nichtlösliches Zellmaterial wurde durch differenzielle Zentrifugation 1. 10.000xg 10' 2. 100.000xg 120' entfernt. Das lösliche Protein des Überstandes wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (85 %ige Sättigung bei 4°C) ausgefällt. Das Pellet wurde in Imidazol-HCl 50 mmol/l (pH 7.4) auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt (Schritt I). Die nachfolgende Chromatographie an Biogel P2 (5 x 40 cm, BioRad München) diente zum Entsalzen der Proteinfraktion (Schritt II) bevor sich eine Affinitätschromatographie an Blue-Sepharose CL-6B (1.5 x 15 cm in Tris-HCl 50 mmol/l pH 8.0) anschloß. Die Flußgeschwindigkeit betrug 0.5 ml/min.

Nach dem Auswaschen des nichtadsorbierten Materials mit 3-4 Säulenvolumina Äquilibrierungspuffer wurde die APS-Kinase mit NaCl 1.5 mol/l in Äquilibrierungspuffer eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt (Schritt III), gegen kristalline Saccharose dialysiert und durch Gelfiltration an Sephacryl S300 (2.5 x 50 cm) in Imidazol-HCl 50 mmol/l (pH 7.4) fraktioniert. Die Proteinfractionen, die APS-Kinase Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt (Schritt IV) und an dem Austauscher-Gel PBE

TM 94 (in Histidin-HCl 25 mmol/l pH 6.2) konzentriert und mit 200 ml des entsprechenden Ampholyten (Polybuffer 74, 1:10 mit A.bidest pH 5.0) eluiert. Das aktive Protein eluierte im pH-Bereich von 5.5 bei einer Flußgeschwindigkeit von 0.5 ml/min (Schritt V). Das Entfernen der Ampholyte aus der Proteinfraction konnte, wie bereits beschrieben, durch Affinitätschromatographie an Blue- oder Red-Sepharose CL-6B durchgeführt werden.

b) *Saccharomyces cerevisiae*:

Bäckerhefe (500 Gramm) wurde nach einer Vorschrift von Shapiro und Stadtmann (1970) in einem Toluol-Bicarbonatgemisch lysiert. Der Rohextrakt wurde durch Filtration und Zentrifugation (20.000x g 30 min) geklärt und anschließend mit festem Ammoniumsulfat versetzt. Das Protein, das zwischen 35 und 85 %iger Sättigung bei 4°C präzipitierte, wurde abzentrifugiert (15.000x g 15 min) und in Imidazol-HCl 50 mmol/l (pH 6.8), EDTA 1 mmol/l, MSH 10 mmol/l resuspendiert (Schritt I). Der Entsalzungsschritt, sowie Affinitäts- und Gelchromatographie (Schritte II-IV) erfolgten analog zu den Reinigungsschritten bei *E.coli* (5.1a). Das Enzym aus Hefe konnte aufgrund seines alkalischen pI-Wertes (7,4) nicht an den Polybuffer-Austauscher bei pH 7.4 adsorbiert werden, und wurde zur weiteren Reinigung nach Adsorption an Red-Sepharose CL-6B (0.9 x 5 cm) mit je 20 ml ATP 10 mmol/l (neutralisiert), Ammoniumsulfat 1.5 mol/l, NaCl 0.5, 1.0 und 2.0 mol/l eluiert. 80 % der APS-Kinase Aktivität konnten ausschließlich in der 2molaren NaCl-Lösung nachgewiesen werden.

c) *Chlamydomonas reinhardtii*:

Die einzellige Grünalge wurde in 10 l Flaschen bei kontinuierlicher Beleuchtung (ca. 1500 Lux) mit 5 % CO₂ (v/v) in Luft angezogen. Das Nähr-

medium nach Gorman und Levene (1965) ergab einen Ertrag von 3.75 g/l. Die Algen wurden im Bereich der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation (2000x g 15 min) abgeerntet. Nach der Bestimmung des Frischgewichtes wurden die Algen in Tris-HCl 50 mmol/l (pH 7.7), NaF 100 mmol/l resuspendiert. Dabei wurde das Puffervolumen durch Multiplikation des Zellfrischgewichtes mit dem Faktor 3.4 ermittelt. Nach Zellaufschluß in der Ribl-Pressen bei 7.000 psi wurde das Rohhomogenat 1:1 mit Puffer verdünnt, durch Zentrifugation (48.000x g, 30 min) geklärt und der schwachgrüne Überstand mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 85 % versetzt. Das präzipitierte Protein (Schritt I) wurde in Imidazol-HCl 50 mmol/l (pH 7.4), MSH 10 mmol/l resuspendiert und analog zu den Schritten (II-IV) bei E.coli angereichert.

Kovalente Chromatographie an aktivierter Thiol-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) erfolgte nach drastischer Vorinkubation des Proteins in DTT (20mmol/l 2-10 h, 4°C) nach Schritt IV, und nachfolgender Affinitätschromatographie zur Entfernung des freien Thiols. Die APS-Kinase wurde von der Affinitätssäule (0.9 x 5 cm) mit NaCl 1.5 mol/l direkt in eine zweite Säule eluiert, die die Thiolmatrix enthielt (0.9 x 3 cm in Tris-HCl 100 mmol/l pH 7.6, EDTA 10 mmol/l und NaCl 0.5 mol/l). Dabei betrug die Flußgeschwindigkeit 0.1 ml/min. Nach dem Auswaschen des nicht-adsorbierten Materials konnte die kovalent gebundene APS-Kinase mit DTT (10 mmol/l) desorbiert werden.

In Ergänzung dazu wurde mit dem Enzym eine nach Jander und Schwenn (1984) modifizierte Chromatofokussierung im pH-Bereich von 7 - 5 ausgeführt, sowie eine hydrophobe Chromatographie an Phenyl-Sepharose CL-4B (Pharmacia, Freiburg) im absteigenden KCl-Gradienten (3 - 0 mol/l) bei ansteigender Ethylenglycoll-Konzentration (0 - 50 % v/v).

5.2 Messung der APS-Kinase Aktivität

a) Quantitative Produktbestimmung durch HPLC

Die Enzymaktivität wurde wie bereits beschrieben (Schwenn & Jender 1980, 1981, Jender & Schwenn 1984) durch Separierung des ^{35}S -markierten Reaktionsproduktes PAPS aus dem Reaktionsansatz mithilfe der reversed-phase ion-paired HPLC bestimmt. Erfassung, Darstellung und Auswertung der Radioaktivität erfolgte mit einem apple II Computer und der entsprechenden Hard- und Software der Firma Isomess.

b) Gekoppelter Test mit dem PAPS-Reduktase/Thioredoxin-System

Die Aktivität der APS-Kinase wurde durch Umsatz des Reaktionsproduktes ^{35}S -PAPS zu ^{35}S - SO_3 mit dem PAPS-Reduktase/Thioredoxin-System bestimmt. Diese Methode, die die Bestimmung einer großen Anzahl von APS-Kinase Tests innerhalb kürzester Zeit ermöglichte, wurde speziell für den Aktivitätsnachweis in Elektrophorese- und Säuleneluatens eingesetzt.

Der APS-Kinase Test enthielt in einem Volumen von 100 μl : Imidazol-HCl 100 mmol/l (pH 6.8 für *C.reinhardtii* und Hefe, pH 8.1 für *E.coli*), ^{35}S -APS 10-20 $\mu\text{mol/l}$ (spez.Aktivität 40-100.000 cpm/nmol), MgCl_2 2 mmol/l, ATP 0.2 mmol/l und Enzymprotein 10-30 μg . Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 30°C wurden 150 μl Reaktionsgemisch des PAPS-Reduktase-mix zugegeben, der sich zusammensetzte aus: Tris-HCl 50 mmol/l (pH 7.6) NaF 0.5 mmol/l, EDTA 4mmol/l, DTT 6 mmol/l, PAPS-Reduktasefraktion 5 - 20 mg/ml (spez.Aktivität 20 nmol/mgxmin) und Thioredoxin 10 - 50 μg . Die Reaktion wurde weitere 15 min bei 30°C inkubiert, bevor 125 μl Iso-propanol (99 %) und 2 μmol unmarkiertes Trägersulfit zugegeben wurden. Durch Ansäuerung mit 500 μl 6N H_2SO_4 wurde das gebildete ^{35}S -Sulfit in einem geschlossenen Scintillationsgefäß in 0.5 ml Trioctylamin destilliert (180 min, 60°C). Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit

(Quickszint 272, Zinsser) wurde die freigesetzte Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler (TRI-CARB Packard) bestimmt und über die spezifische Radioaktivität die Menge an gebildetem SO_3^{2-} errechnet.

c) Photometrischer Nachweis der APS abhängigen ADP-Bildung

Der Enzymtest nach Burnell & Whatley (1975) wurde nach geringfügiger Veränderung hier verwendet. Die Hilfsenzyme (L-Lactat Dehydrogenase EC 1.1.1.27, Pyruvat-Kinase EC 2.7.1.40 und 3'-Nucleotidase EC 3.1.3.6 waren von höchster Reinheit (Boehringer Mannheim; Sigma München).

Da der Test durch eine Vielzahl von störenden Nebenaktivitäten (Myokinase, ADP-Sulfurylase, ATPasen) verfälscht werden kann, konnte er nur für Enzymfraktionen nach dem Chromatofokussierungs-Schritt eingesetzt werden. Auf eine Zugabe von KCN und NaF konnte dann verzichtet werden.

d) Aktivierung - Deaktivierung der APS-Kinase

Generell konnte das Enzym in einer hochaktiven Form erhalten werden, wenn reduzierende Thiole bereits in einem frühen Stadium der Präparation eingesetzt wurden. Aktivierung wurde notwendig in späten Phasen der Präparation, wenn ein unbekannter Anteil der Aktivität durch Lagerung oder Chromatographie verloren ging.

Für die Aktivierung wurde das Enzym in einem Volumen von 50 µl vorinkubiert. Darin waren enthalten: Imidazol-HCl 100 mmol/l (pH 6.8 bzw 8.1 für E.coli), DTT 10 mmol/l, Thioredoxin 10 µl und 20 µl Enzymprotein. Dieser Ansatz wurde 5 min bei 30°C inkubiert und dann wurde für weitere 2 Minuten die Reaktion in Gegenwart der Substrate fortgesetzt.

Zur Desaktivierung wurde das Enzym unter identischen Bedingungen vorbehandelt, wobei das DTT/Thioredoxin-System durch die desaktivierende Substanz (2 mmol/l) ersetzt wurde. In diesem Fall wurde die Inkubationszeit auf 10 Minuten verlängert.

5.3 Reinigung von PAPS-Reduktase und Thioredoxin-Reduktase

a) E.coli (in Anlehnung an Tsang 1981a)

Die Ausschußfraktion nach Chromatographie des Rohextraktes an Blue-Sepharose (Schritt III, vergl 5.1a) wurde mit Essigsäure 1mol/l im Eisbad auf den pH-Wert von 5.0 titriert, und das präzipitierte Protein nach Zentrifugation (10.000x g 15 min) in Na-Phosphat Puffer 20 mmol/l (pH 7.0), MSH 10 mmol/l und EDTA 1 mmol/l (=Puffer A) resuspendiert (Schritt A). Nach einer Dialyse gegen 10 l Puffer A (12 h) wurde die Fraktion an DEAE-Sephacel (5 x 20 cm Pharmacia, Freiburg) adsorbiert und mit Puffer A (200 mmol/l Na-Phosphat) eluiert (Schritt B). Das Eluat wurde mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 70 % versetzt und an Sephacryl S300 (3 x 85 cm in Tris-HCl 50 mmol/l, MSH 10 mmol/l und EDTA 1 mmol/l =Puffer B) fraktioniert. Die aktiven Fraktionen (Schritt C) der PAPS-Reduktase wurde vereinigt und an 2'5'ADP-Sepharose (0.9 x 9 cm Pharmacia Freiburg) in Puffer B chromatographiert (Schritt D). Das nichtadsorbierte Material wurde wie bereits beschrieben an DEAE-Sephacel gebunden und mit 600 ml eines konvexen Phosphat-Gradienten (0 - 200 mmol/ Puffer A) eluiert (Schritt E). Die Fraktionen, die PAPS-Reduktase Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und nach Rechromatographie an S300 1 Stunde in DTT 10 mmol/l inkubiert. Nach Umäquilibrierung des Proteins in N2-gespülten Puffer B an DEAE-Sephacel (0.9 x 11 cm) wurde eine kovalente Chromatographie durchgeführt (vergl. 5.1c). Das so gereinigte Enzym (Schritt F) konnte unter geringem Aktivitätsverlust (20 %) mindestens 8 Monate bei -10 °C aufbewahrt werden. Die in Schritt D an das Affinitäts-Gel gebundene Thioredoxin-Reduktase wurde mit NADPH 1mmol/l in Puffer B von dem Liganden gelöst und anschließend durch Chromatofokussierung im absteigenden pH-Gradienten (7-4) hochangereichert. Das Enzym wurde im pH-Intervall um 4.0 erhalten.

b) *Saccharomyces cerevisiae*

Die Reinigung der PAPS-Reduktase erfolgte analog zur Präparation von *E. coli*. Anstelle des Phosphat-Puffers wurde in allen Schritten Tris-HCl (pH 7.6) verwendet. In Schritt E wurde der exponentielle Ionengradient durch einen linearen NaCl-Gradienten (500 ml 0-400mmol/l) ersetzt. Der Aktivitätsverlust betrug nach einer Woche bei einer Lagerungstemperatur von - 10° C bereits 86 %.

Auf eine Reinigung der Thioredoxin-Reduktase wurde im Fall der Hefe verzichtet.

5.4 Aktivitätsbestimmung der PAPS-Reduktase und Thioredoxin-Reduktase

a) PAPS-Reduktase (DTT als Elektronendonator)

Der Inkubationsansatz enthielt in einem Volumen von 250 µl: Tris-HCl 40 mmol/l (pH 7.6), NaF 0.4 mmol/l, EDTA 3.2 mmol/l, DTT 6,4 mmol/l, ³⁵S-PAPS 50 µmol/l (spez. Aktivität 40.-100.000 cpm/nmol, Thioredoxin 2-20 µg und Enzym 10 -100 µg. Die Ansätze wurden 15 Minuten bei 30°C inkubiert und nach Zugabe von 2 µmol unmarkiertem Trägersulfit und 125 µl Isopropanol wurde der säurelabile Schwefel bestimmt.

b) Thioredoxin-Reduktase

In diesem Fall wurde im PAPS-Reduktase Ansatz der Elektronendonator DTT durch NADPH 5 mmol/l ersetzt, und durch Zugabe von Thioredoxin-Reduktase (10 - 75 µg) wurde die Reaktion gestartet.

5.5 Reinigung und Isolierung von Thioredoxin

a) aus Spinat

Die Aufarbeitung der plastidären Thioredoxine aus Spinat m und f bis zur Homogenität erfolgte nach dem Verfahren von Schürmann et al. (1981).

b) aus *E.coli*

Thioredoxin aus *E.coli* wurde in Anlehnung an Tsang (1981a) isoliert. Eine zweifache Chromatofokussierung in den pH-Bereichen 7-4 und 5-4 nach dem ersten DEAE-Cellulose Schritt ergab ein homogenes Protein. Hinweise für eine Glutaredoxin-Aktivität wurden im Verlauf der Präparation nicht erhalten.

c) aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zu Beginn der Präparation wurde die Thioredoxin-Fraktion aus Bäckerhefe nach der Vorschrift von Porque et al.(1970) einschließlich des ersten DEAE-Schrittes angereichert. Durch den Einsatz der Chromatofokussierung konnten Thioredoxin I und II vollständig voneinander separiert werden.

d) aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Nach Schritt 3 (vergl. 5.1c) wurde die Fraktion mit Essigsäure 1 mol/l auf einen pH-wert von 5.0 eingestellt. Der erhaltene Überstand wurde nach Zentrifugation (15.000x g, 15 min) mit Ammoniak 1mol/l neutralisiert und zu 85 % mit festem Ammoniumsulfat gesättigt. Nach einer Dialyse (12 h) des Proteinpräzipitats gegen Tris-HCl 30 mmol/l (pH 7.6) wurde das lösliche Material an DEAE-Sephacel (2 x 15 cm) konzentriert und die Thioredoxin Aktivität mit 400 ml eines linearen NaCl-Gradienten (0 - 0.2 mol/l) im Bereich von 0.06 mol/l erhalten. Eine anschließende Chromatofokussierung im absteigenden pH-Gradienten von 6-4 führte zu einer Trennung von 2 Thioredoxin Aktivitäten aus der Alge bei pH 6 und pH 5.7.

5.6 Nachweis der Thioredoxin Aktivität

a) Fruktose-1,6-bisphosphatase (Thioredoxin f spezifisch)

Das Enzym aus Spinatchloroplasten wurde nach einer Vorschrift von Buchanan et al. (1976) gereinigt. Dabei wurde der Gelfiltrationsschritt an Sephadex G100 durch Sephacryl S300 unter identischen Bedingungen er-

setzt.

Thioredoxin f Aktivität wurde nach Vorinkubation (5') mit der gereinigten Fruktose-1,6-bisphosphatase (10 µg) in Gegenwart von Tris-HCl 100 mmol/l (pH 7.9), DTT 4 mmol/l, $MgSO_4$ 1 mmol/l und Thioredoxin f (2 -20 µg) in einem Volumen von 450 µl bestimmt. Nach Zugabe von 50 µl Fruktose-1,6-bisphosphat (40 mmol/l) wurde nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten das gebildete Phosphat gegen einen Referenzansatz ohne Thioredoxin nach einer Methode von Wolosiuk et al. (1976) bestimmt.

b) NADP-abhängige Malatdehydrogenase (Thioredoxin m spezifisch)

Der Präparation des Enzyms lag das Verfahren von Ferte et al. (1982) zugrunde. Anstelle der Affinitätschromatographie wurde mit dem Enzym eine Gelfiltration an Sephacryl S300 durchgeführt.

Die Malatdehydrogenase (15 -27 µg) wurde bei 25°C in einem Volumen von 0.1 ml mit Thioredoxin (1 - 50 µg) in Tris-HCl 50 mmol/l (pH 7.9) und DTT 20 mmol/l 10 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde das Vorinkubationsgemisch in eine 1 ml-Küvette pipettiert, die in einem Gesamtvolumen von 1 ml Tris-HCl 100 mmol/l (pH 7.9), Oxalacetat 1 mmol/l und NADPH 0.2 mmol/l enthält. Die Änderung der optischen Dichte bei 340 nm wurde kontinuierlich im Spektralphotometer verfolgt.

c) PAPS-Reduktase (geringe Spezifität)

Der Thioredoxinnachweis mithilfe der PAPS-Reduktase aus E.coli erfolgte nach der bereits beschriebenen Methode für die PAPS-Reduktase (vergl 5.4). In diesem Fall konnte auf eine Vorinkubation des Enzyms mit Thioredoxin verzichtet werden.

5.7 Biosynthese der ^{35}S -Sulfonukleotide APS und PAPS

a) ^{35}S -PAPS

Die Synthese der Sulfonukleotide erfolgte enzymatisch durch Inkubation von ATP mit $^{35}\text{S-SO}_4$ in Gegenwart der Sulfat-aktivierenden Enzyme. Mit Ausnahme der APS-Kinase waren alle benötigten Enzyme im Handel erhältlich. Durch das rasche Aufarbeitungsverfahren und die Stabilität der APS-Kinase aus Hefe (vergl. 5.1b) war es möglich, den Syntheseansatz zu vervollständigen. Aufgrund der Produktinhibierung durch ADP (vergl. 2.2.4.3) wurde der Ansatz durch das ATP-regenerierende System (PEP/Pyruvatkinase) ergänzt.

Der Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 20 ml folgende Komponenten: Triethanolamin-HCl 175 mmol/l (pH 7.4), Phosphoenolpyruvat 1 mmol/l ATP (neutral.) 2.5 mmol/l, MSH 0.1 mmol/l, HgSO_4 10 mmol/l, trägerfreies $^{35}\text{S-SO}_4$ (Amersham) 10 mCi, 12 U Pyrophosphatase aus Hefe (Sigma Chem.), 10 U ATP-Sulfurylase aus Hefe (Sigma Chem.), 40 U Pyruvatkinase aus Kanninchenmuskel (Boehringer) und APS-Kinase aus Hefe nach Passage durch PBE 94.

Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert und die Produktbildung stündlich durch HPLC-Kontrolle verfolgt. Nach einer Inkubationszeit von 10 h wurde der Ansatz an einer Anionenaustauschersäule (1.5 x 15 cm) des Typs DEAE-TSK (Merck, Darmstadt) im linearen KCl-Gradienten (0 - 0.4 mol/l) in Tris-HCl 25 mmol/l (pH 8.0) eluiert. Dabei wurde 1 mCi ^{35}S -PAPS mit einer spezifischen Radioaktivität von 110.000 cpm/nmol erhalten.

b) ^{35}S -APS

Durch Inkubation mit einer 3'-Nukleotidase aus Gerste (Sigma Chem.) wurde ^{35}S -PAPS vollständig zu ^{35}S -APS umgesetzt. Die Reinigung des Nukleotids erfolgte ebenfalls an DEAE-TSK im linearen KCl-Gradienten (0 -

0.2 mol/l) in Tris-HCl 25 mmol/l (pH 8.0).

5.8 Proteinbestimmung

Lösliches Protein wurde mit Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Heidelberg) nach dem Verfahren von Bradford (1976) bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin.

5.9 Elektrophorese

5.9.1 Isoelektrische Fokussierung

a) Ultradünnschicht-IEF (UDIEF)

Die isoelektrische Fokussierung auf Servalyt-Precotes (Serva, Heidelberg) wurde bei geringer Änderung nach den Angaben des Herstellers ausgeführt. Das Gel wurde vor dem Auftrag der Proben mit 500 Vh vorfokussiert (Einstellung: 1700 V, 10 mA, 2-4 W je nach Größe). Die Kühltemperatur lag bei 4°C. Nach dem Lauf wurden die Gele fixiert (15 % TCA), mit Serva Violett gefärbt (100 mg in 250 ml Methanol-Eisessig-Wasser/ 4:1:5) und nach dem Entfärben im warmen Luftstrom getrocknet.

b) Agarose-IEF

Zur Verfügung stand das horizontale Flachbettelektrophoresesystem FBE 3000 (Pharmacia, Freiburg) sowie die Spannungsversorgung ECPS 3000/150. Die 1.5 %igen Gele (115 x 225 x 1 mm) wurden nach den Vorschriften des Herstellers angefertigt und enthielten zusätzlich 1 % Triton X 100. Nach einer Vorfokussierung von 1000 Vh wurden die Proben (0.3-0.4 ml) direkt auf das Gel appliziert, wobei ein Abstand von 0.5 cm vom Rand des Gels eingehalten wurde. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Leistung (20 W) unter den vorgeschriebenen Bedingungen fortgesetzt. Im Anschluß an den Lauf wurde das Gel in 3 Abschnitte längs zur Laufrich-

tung geschnitten. Ein Streifen (2 mm breit) wurde zum Proteinnachweis (Willoughby & Lambert 1983) verwendet. Ein zweiter Gelstreifen (1 cm breit) wurde quer zur Laufrichtung in 28 Abschnitte (7.5 mm) geteilt und die Stücke in 1 ml A. bidest eluiert. Mit diesen Fraktionen wurde der pH-Gradient bestimmt. Der größte Teil des Gels wurde ebenfalls in 28 Stücke geteilt und in 2 ml Puffersubstanz eluiert. Mit diesen Fraktionen wurde das Aktivitätsprofil aufgenommen.

5.9.2 SDS-Gelelektrophorese

SDS-Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamid-Gradientengelen nach einer Vorschrift von Chua (1980) ausgeführt.

Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R250 oder mit dem Silbernachweis nach Oakley et al.(1980).

5.10 Autoradiographie

Die IEF-Folien wurden nach ausgiebigem Fixieren, Anfärben und Entfärben getrocknet und in direktem Kontakt mit einem Kodak XOMAT AR-Film zwischen 2 Platten fixiert. Die Expositionsdauer bei Raumtemperatur betrug 7 Tage. Die Nachweisgrenze für das ³⁵S-Isotop lag unter diesen Bedingungen bei 30 cpm/Proteinbande.

6. Literatur

- Abrams, W.R., Schiff, J.A.: Studies of sulfate utilisation in algae
11. An enzyme-bound intermediate in the reduction of adenosine-5'
phosphosulfate (APS) by cell-free extracts of wild-type *Chlorella*
and mutants blocked for sulfate reduction
Arch. Microbiol. 94 (1973) 1 - 10
- Ashai, T.: Sulfur metabolism in higher plants. IV. Mechanism of sulfate
reduction in chloroplasts
Biochim. Biophys. Acta 82 (1964) 58 - 66
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of micro-
gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
binding
Anal. Biochem. 72 (1976) 248 - 254
- Buchanan, B.B.: Enzyme regulation in photosynthesis
in: *Advances in Photosynthetic Research* (Sybesma, C., ed.) Vol III
pp.573 - 580 Martinus Nijhoff/Dr. W.Junk Publishers The Hague (1984)
- Buchanan, B.B.: Role of light in the regulation of chloroplast enzymes
Ann. Rev. Plant Physiol. 31 (1980) 341 - 374
- Buchanan, B.B., Schürmann, P., Wolosiuk, R.A.: Appearance of sedoheptu-
lose 1,7-diphosphatase activity on conversion of chloroplast
fructose 1,6-diphosphatase from dimer to monomer form
Biochem. Biophys. Res. commun. 69 (1976a) 970 - 978
- Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A.: Photosynthetic regulatory protein found
in animal and bacterial cells
Nature 264 (1976b) 669 - 670
- Burnell, J.N., Whatley, F.R.: A new, rapid and sensitive assay for
adenosine 5'-phosphosulphate (APS) -kinase
Anal. Biochem. 68 (1975) 281 - 288
- Cao, R.Q., Johnson, T.C., Kung, J.E., Buchanan, B.B.: Developmental
studies on plant thioredoxin systems
in: *Advances in Photosynthetic Research* (Sybesma, C., ed.) Vol IV
pp.877 - 880 Martinus Nijhoff/Dr.W.Junk Publishers The Hague (1984)
- Chua, N.H.: Electrophoretic analysis of chloroplasts proteins
in: *Methods of Enzymology* Vol 69C, pp 434 - 446, San Pietro ed.,
Academic press 1980
- Conley, R.R., Pigiet, V.: In vivo distribution of phosphothioredoxin
and thioredoxin in *E.coli*
J. Biol. Chem. 253 (1978) 5568 - 5572

- Crawford, N.A., Yee, B.C., Nishizawa, A.N., Buchanan, B.B.: Occurrence of cytoplasmic f- and m-type thioredoxins in leaves
FEBS Lett 104 (1979) 141 - 145
- Eklund, H., Cambillau, C., Sjöberg, B.-M., Holmgren, A., Jörnvall, H., Höög, J.-O., Bränden, C.-I.: Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins
EMBO J. 3 (1984) 1443 - 1449
- Ferte, N., Meunier, J.-C., Ricard, J., Buc, J., Sauve, P.: Molecular properties and thioredoxin-mediated activation of spinach chloroplastic NADP-malate dehydrogenase
FEBS Lett. 146 (1982) 133 - 138
- Gorman, D.S., Levene, E.C.: Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*
Proc. Natl. Acad. Sci USA 54 (1965) 1665 - 1669
- Hall, D.A., Baldesten, A., Holmgren, A., Reichard, P.: Yeast thioredoxin
Eur. J. Biochem. 23 (1971) 328 - 335
- Holmgren, A., Ohlson, I., Grankvist, M.-L.: Thioredoxin from *E. coli*
J. Biol. Chem. 253 (1978) 430 - 436
- Holmgren, A.: Glutathion-dependent synthesis of desoxyribonucleotides
J. Biol. Chem. 254 (1979a) 3672 - 3677
- Holmgren, A.: Reduction of disulfides by thioredoxin
J. Biol. Chem. 254 (1979b) 9113 - 9119
- Holmgren, A.: Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide
J. Biol. Chem. 254 (1979c) 9627 - 9632
- Holmgren, A.: Glutathion dependent synthesis of deoxyribonucleotides
J. Biol. Chem. 254 (1979d) 9664 - 9671
- Holmgren, A.: Thioredoxin: structure and function
Trends Biochem Sci., 6 (1981) 26 - 29
- Hopper, S., Iurlano, D.: Properties of a thioredoxin from rabbit bone marrow which fails to serve as a hydrogen donor for the homologous ribonucleotide reductase
J. Biol. Chem. 258 (1983) 13453 - 13457
- Hutcheson, S.W., Buchanan, B.B.: Enzyme regulation in crassulacean acid metabolism photosynthesis
Plant Physiol. 72 (1983) 870 - 885

- Imhoff, J.F.: Aspekte des assimilatorischen Sulfatstoffwechsels in Rhodospirillaceae
Thesis Bonn 1980
- Jaquot, J.P., Joly, C., Gadal, P.: Ribulosebiphosphate carboxylase small subunit function as a thioredoxin in the dithiothreitol-dependent activation of NADP-malate dehydrogenase
Biochim. Biophys. Acta 745 (1983) 97 - 101
- Jender, H.G.: Reinigung und Charakterisierung der APS-Kinase aus Chlamydomonas reinhardtii CW 15
Thesis Bochum 1982
- Jender, H.G., Schwenn, J.D.: Purification and properties of the ATP: adenylylsulphate 3'-phosphotransferase from Chlamydomonas reinhardtii
Arch. Microbiol. 138 (1984) 9 - 14
- Laurent, T.C., Moore, E.C., Reichard, P.: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides
J. Biol. Chem. 239 (1964) 3436 - 3444
- Luthmann, M., Holmgren A.: Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization
Biochemistry 21 (1982) 6628 - 6633
- Mannervik, B., Axelson, K., Sundewall, A.-C., Holmgren, A.: Relative contributions of thioltransferase- and thioredoxin-dependent systems in reduction of low molecular-mass and protein disulfides
Biochem. J. (1983) 213 519 - 523
- Maness, P., Orenco, A.: A pyrimidine nucleoside monophosphate kinase from rat liver
Biochemistry 14 (1975) 1484 - 1489
- McKinney, D.W., Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A.: Association of a thioredoxin-like protein with chloroplast coupling factor (CF1)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 86 (1979) 1178 - 1184
- Nishizawa, A., Buchanan, B.B.: Enzyme regulation in C4 photosynthesis
J. Biol. Chem. 256 (1981) 6119 - 6126
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels
Anal. Biochem. 105 (1980) 361 - 363
- Papen, H., Bothe, H.: The activation of glutamine synthetase from the cyanobacterium Anabaena cylindrica by thioredoxin
FEMS Microbiol. Lett. 23 (1984) 41 - 46

- Porque, P.G., Baldesten, A., Reichard, P.: The involvement of the thio-redoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate
J. Biol. Chem. 245 (1970b) 2371 - 2374
- Porque, P.G., Baldesten, A., Reichard, P.: Purification of a thio-redoxin system from yeast
J. Biol. Chem. 245 (1970a) 2363 - 2370
- Rennenberg, H.: The fate of excess sulfur in higher plants
Ann. Rev. Plant Physiol. 35 (1984) 121 - 153
- Renosto, F., Seubert, P.A., Segel, I.H.: Adenosine 5'-phosphosulfate Kinase from *Penicillium chrysogenum*
J. Biol. Chem. 259 (1984) 2113 - 2123
- Renosto, F., Seubert, P.A., Knudson, P., Segel, I.H.: APS-Kinase from *Penicillium chrysogenum*: Dissociation and Reassociation of subunits as the basis of the reversible heat inactivation
(in press)
- Robins, P.W.: Sulfate activating enzymes
in: S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Methods of enzymology Vol V, Academic Press (1962) pp. 964 - 977
- Robbins, P.W., Lipman, F.: Separation of two enzymatic phases in active sulfate synthesis
J. Biol. Chem. 233 (1958) 681 - 686
- Schiff, J.A., Fankhauser, H.: Assimilatory sulfate reduction
in: Biology of inorganic nitrogen and sulfur. H.Bothe, A.Trebst eds., pp. 153 - 168 (1981)
- Schmidt, A., Schwenn, J.D.: On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction
in: Proc. II Int. Congr. Photosynthesis Stresa (1971) pp. 507 - 514, Forti, G., Avron, M., Melandri, eds. The Hague W. Junk 1971
- Schmidt, A.: Über Teilreaktionen der Photosynthetischen Sulfatreduktion in zellfreien Systemen aus Spinatchloroplasten und *Chlorella*
Z. Naturforsch. 27b (1972a) 183 - 192
- Schmidt, A.: On the mechanism of photosynthetic sulfate reduction. An APS-sulfotransferase from *Chlorella*
Arch. Microbiol. 84 (1972b) 77 - 86
- Schmidt, A.: Sulfate reduction in a cell-free system of *Chlorella*. The ferredoxin dependent reduction of a protein-bound intermediate by a thiosulfonate-reductase
Arch. Microbiol. 93 (1973) 29 - 52

- Schmidt, A.: The adenosine-5'-phosphosulfate sulfotransferase from spinach. Stabilization, partial purification and properties
Planta 130 (1976) 257 - 263
- Schmidt, A.: Assimilatory sulfate reduction via 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) and adenosine-5'-phosphosulfate in blue-green algae
FEMS Microbiol. Lett. 1 (1977b) 137 - 140
- Schmidt, A. : The role of thioredoxins for enzyme regulation in cyanobacteria
in: *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. H.Bothe, A.Trebst eds., pp 327 - 333 Springer 1981
- Schriek, U., Schwenn, J.D.: NADPH linked activation of thioredoxin dependent enzymes from spinach chloroplast
in: *Advances in Photosynthesis Research* (Sybesma, C.ed.) Vol III pp. 705 - 708, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague (1984)
- Schürmann, P., Wolosiuk, R.A.: Studies on the regulatory properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase
Biochim. Biophys. Acta 522 (1978) 130 - 138
- Schürmann, P., Maeda, K., Tsugita, A.: Isomers in thioredoxins of spinach chloroplasts
Eur. J. Biochem 116 (1981) 37 - 45
- Schwenn, J.D.: Untersuchungen zur Kinetik der photosynthetischen Sulfatreduktion isolierter Chloroplasten
Thesis Bochum 1970
- Schwenn, J.D., El-Shagi, H., Kemena, A., Petrak, E.: On the role of S: sulfotransferases in assimilatory sulfate reduction by plant suspension cultures
Planta 144 (1979) 419 - 425
- Schwenn, J.D., Jender, H.G.: Reversed-phase HPLC of adenine nucleotides Application to the kinetics of a PAPS-sulfotransferase from plants
J. Chromatogr. 193 (1980) 285 - 290
- Schwenn, J.D., Jender, H.G.: A kinetic investigation of the APS-Kinase from *Chlamydomonas reinhardtii* CW 15
Phytochem. 20 (1981) 601 - 604
- Schwenn, J.D., Schriek, U.: A new role for thioredoxin in assimilatory sulphate reduction, Activation of the adenylsulphate kinase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* CW 15
FEBS Lett 170 (1984) 76 - 80

- Schwenn, J.D., Trebst, A.: Photosynthetic sulfate reduction by chloroplasts
in: The intact chloroplast, J. Barber, ed., 315 - 334 Elsevier 1976
- Scopes, R.: Protein purification, principles and practice
in: Springer Advanced Texts in Chemistry (Cantor, C.R. ed.) Springer Verlag New York (1982)
- Segel, I. H.: Enzyme kinetics
Wiley (1975)
- Shapiro, S.K.: S-Adenosylmethionine: L-homocysteine s-methyltransferase
Methods. Enzym. 17b (1971) 400 - 405
- Siegel, L.M.: Biochemistry of the sulfur cycle, in: Greenberg, D.M., Metabolic pathways Vol VII, Academic Press 1975, pp. 217 - 286
- Soulie, J.M., Buc, J., Meunier, J.-C., Pradel, J., Ricard, J.: Molecular properties of chloroplastic thioredoxin f and the photoregulation of the activity of fructose 1,6-bisphosphatase
Eur. J. Biochem. 119 (1981) 497 - 502
- Thelander, L., Reichard, P.: Reduction of ribonucleotides
Ann. Rev. Biochem. 48 (1979) 133 - 158
- Tischner, R., Schmidt, A.: A thioredoxin-mediated activation of glutamin synthetase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*
Plant Physiol. 70 (1982) 113 - 116
- Tsang, M. L.-S.: Assimilatory sulfate reduction in *E.coli*: identification of the alternate cofactor for adenosine 3'-phosphate 5' phosphosulfate reductase as glutaredoxin
J. Bacteriol. 146 (1981a) 1059 - 1066
- Tsang, M. L.-S.: Thioredoxin/glutaredoxin System of *Chlorella*
Plant Physiol. 68 (1981b) 1098 - 1104
- Tsang, M. L.-S., Schiff, J.A.: Studies of sulfate utilization by algae
18. Identification of glutathione as physiological carrier in assimilatory sulfate reduction by *Chlorella*
Plant Sci. Lett. 11 (1978) 177 - 183
- Tsang, M. L.-S., Schiff, J. A.: Sulfate-reducing pathway in *E. coli* involving bound intermediates
J. Bacteriol. 125 (1976) 923 - 933
- Tsugita, A., Maeda, K., Schürmann, P.: Spinach chloroplast thioredoxins in evolutionary drift
Biochem. Biophys. Res. Commun. 115 (1983) 1 - 7

- Urlaub, H., Jankowski, G.: Sulfate reduction in *Catharanthus roseus* (L)
Planta 155 (1982) 154 - 161
- Varma, A.K., Nicholas, D.J.D.: Metabolism of 35S-Sulphate and properties of APS-kinase and PAPS-reductase in *Nitrobacter agilis*
Arch. Microbiol. 78 (1971) 99 - 117
- Wagner, W., Follmann H.: Thioredoxin from green algae
Biochem. Biophys. Res. Commun. 77 (1977) 1044 - 1051
- Wagner, W., Follmann, H., Schmidt, A.: Multiple functions of thioredoxins
Z. Naturforsch. 33c (1978) 517 - 520
- Willoughby, E.W., Lambert, A.: A sensitive silver stain for proteins in agarose gels
Anal. Biochem. 130 (1983) 353 - 358
- Wilson, L.G., Bierer, D.: The formation of exchangeable sulphite from adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate in yeast
Biochem. J. 158 (1976) 255 - 270
- Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B.: Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by ferredoxin/thioredoxin system
Arch. Biochem. Biophys. 189 (1978) 97 - 101
- Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C., Buchanan, B.B.: Isolation of three thioredoxins from spinach leaves
J. Biol. Chem. 254 (1979) 1627 - 1632
- Wolosiuk, R.A., Nishizawa, A.N., Buchanan, B.B.: Regulation of chloroplast phenylalanine ammonium lyase by the ferredoxin/thioredoxin system
Plant Physiol. 61 (1978) 97 S
- Wolosiuk, R.A., Schürmann, P., Buchanan, B.B.: Thioredoxin and ferredoxin-thioredoxin reductase of spinach chloroplasts
Methods Enzymol. 69 (1980) 382 - 391
- Yee, B.C., de la Torre, A., Crawford, N.A., Lara, C., Carlson, D.E., Buchanan, B.B.: The ferredoxin/thioredoxin system of enzyme regulation in a cyanobacterium
Arch. Microbiol. 130 (1981) 14 - 18

Herrn Prof. Dr. A. Trebst danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeiten, die mir am Lehrstuhl zur Verfügung standen.

Herrn Dr. J.D. Schwenn gebührt mein besonderer Dank für das entgegengebrachte Interesse und für zahlreiche, wertvolle Diskussionen, die wesentlich zum Fortgang der Arbeit beigetragen haben.

Bei Herrn A. Hartung bedanke ich mich besonders für seine Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 5. August 1956 wurde ich als erster Sohn der Eheleute Josef und Anita Schriek geb. Mühr in Dortmund geboren. Nach Abschluß der vierten Klasse der Volksschule besuchte ich 1967 das Humboldt Gymnasium in Dortmund und wechselte nach der sechsten Klasse zum mathem.-naturwiss. Phönix-Gymnasium in Dortmund, wo ich 1976 das Zeugnis der Reife erwarb. Von September 1976 bis Oktober 1977 leistete ich meinen Zivildienst auf einer inneren Station des Evangelischen Krankenhauses Schwerte/Ruhr ab und nahm zum Wintersemester 1977 das Biologiestudium an der Ruhr Universität Bochum auf.

Im Oktober 1981 begann ich im Rahmen meiner Diplomarbeit mit den experimentellen Arbeiten am Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen bei Herrn Prof. Dr. A. Trebst. Im August 1982 beendete ich meine Diplomarbeit mit dem Titel "Zur Biosynthese des Cysteins in Zellkulturen höherer Pflanzen". Seit diesem Zeitpunkt arbeite ich am Lehrstuhl von Herrn Prof. Trebst an der vorliegenden Dissertation.

